

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Utjecaj produljenog vremena odležavanja silaže i
inokulanta na promjene *in vitro* buražne
probavljivosti vlakana u silažama cijele biljke
kukuruza**

DIPLOMSKI RAD

Mirta Skelin

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Hranidba životinja i hrana

**Utjecaj produljenog vremena odležavanja silaže i
inokulanta na promjene *in vitro* buražne
probavljivosti vlakana u silažama cijele biljke
kukuruza**

DIPLOMSKI RAD

Mirta Skelin

Mentor: Doc. dr. sc. Goran Kiš

Neposredni voditelj: Dr. sc. Marija Duvnjak

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Mirta Skelin**, JMBAG 0119014357, rođena 24. 10. 1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj produljenog vremena odležavanja silaže i inokulanta na promjene *in vitro* buražne probavljivosti vlakana u silažama cijele biljke kukuruza

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Mirta Skelin**, JMBAG 0119014357 , naslova

**UTJECAJ PRODULJENOG VREMENA ODLEŽAVANJA SILAŽE I INOKULANTA
NA PROMJENE *IN VITRO* BURAJNE PROBAVLJIVOSTI VLAKANA U
SILAŽAMA CIJELE BILJKE KUKURUZA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Doc. dr. sc. Goran Kiš mentor

Dr. sc. Marija Duvnjak neposredni voditelj

2. Izv. prof. dr. sc. Marina Vranić član

3. Doc. dr. sc. Kristina Kljak član

Zahvala

Ovime zahvaljujem doc. dr. sc. Goranu Kišu na mentorstvu, dr. sc. Mariji Duvnjak na svoj pomoći i smjernicama te strpljenju tijekom provođenja istraživanja, prof. dr. sc. Darku Grbeši na podijeljenom znanju tijekom diplomskog studija. Također zahvaljujem svima iz laboratorija Zavoda za hranidbu životinja za veliku pomoć tijekom izvođenja analiza za istraživanje. Naposljetku hvala, Tomislav i Elin, na razumijevanju i pomoći.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	1
2. Pregled literature	3
2.1. Građa i sastav kukuruza.....	3
2.2. Strukturni ugljikohidrati	3
2.3. Važnost probavljivosti vlakana	4
2.4. Metode određivanja probavljivosti vlakana u buragu	5
2.5. Silaža cijele biljke kukuruza.....	6
2.5.1. Proces siliranja	6
2.6. Utjecaji na kvalitetu silaže.....	7
2.7. Utjecaji na hranjivost silaže.....	8
2.7.1. Stadij zrelosti biljke i suha tvar	8
2.7.2. Strukturni ugljikohidrati.....	9
2.7.3. Tip i hibrid kukuruza	9
2.7.4. Odležavanje silaže.....	10
2.7.5. Sadržaj vodotopivih ugljikohidrata	10
2.8. Aditivi	11
2.8.1. Inokulanti	12
3. Materijali i metode	14
3.1. Priprema silaže	14
3.2. Priprema laboratorijskog uzorka	15
3.3. Kemijske analize.....	16
3.3.1. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana (NDV).....	16
3.3.2. Određivanje <i>in vitro</i> buražne probavljivosti ST i NDV-a.....	18
3.4. Statistička analiza	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Sadržaj NDV-a u ST	23
4.2. IVNDFD nakon 24 sata inkubacije	24
4.3. IVNDFD nakon 48 sati inkubacije	26
4.4. Probavljivost ST nakon 24 sata inkubacije.....	27
4.5. Probavljivost ST nakon 48 sati inkubacije	29
5. Zaključak.....	31
6. Literatura.....	32

Životopis.....	35
----------------	----

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Mirta Skelin**, naslova

Utjecaj produljenog vremena odležavanja silaže i inokulanta na promjene *in vitro* buražne probavljivosti vlakana u silažama cijele biljke kukuruza

Silaža cijele biljke kukuruza je glavno voluminozno krmivo obroka mliječnih krava. Poznata je važnost vlakana silaže u hranidbi životinja, no nije poznato da li se tijekom jednogodišnjeg skladištenja silaže mijenja probavljivost vlakana i suhe tvari. Također, dosadašnja istraživanja pokazuju aktivnost mikroorganizma inokulanta u stabilnoj fazi siliranja te promjene sastava i probavljivosti proteina, ali je nepoznat utjecaj na sastav i probavljivost vlakana. Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi utjecaj inokulanta i produženog vremena odležavanja na sadržaj vlakana mjerenih kao neutralna detergent vlakna (NDV) i *in vitro* probavljivosti NDV i (suhe tvari) ST u silažama cijele biljke kukuruza. U istraživanju je masa za siliranje podijeljena u dvije skupine, jedna je tretirana inokulantom druga je bez inokulanta. Silaže su uzorkovane u periodu od godine dana, s ukupno osam uzorkovanja (0., 5., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan). U pripremljenim uzorcima određen je sadržaj NDV-a, *in vitro* buražna probavljivost ST i NDV nakon 24 i 48 sati u Daisy^{II} ANKOM inkubatoru. Period izuzimanja silaže, dodatak inokulanta i njihova interakcija imali su značajan utjecaj na sadržaj NDV-a. Rezultati rada ukazuju da period izuzimanja silaže značajno utječe na snižavanje *in vitro* probavljivosti suhe tvari i NDV dok dodatak inokulanta nije imao utjecaj na probavljivost ST i NDV silaža cijele biljke kukuruza.

Ključne riječi: kukuruz, silaža, NDV, probavljivost, inokulant, odležavanje

Summary

Of the master's thesis - student **Mirta Skelin**, entitled

Influence of length of storage and inoculation on changes of *in vitro* ruminal digestibility of fibers in whole plant corn silage

The whole plant corn silage is main voluminous feed of dairy cows. It is well known the importance of fiber of whole plant corn silage in animal nutrition, but it is not known whether during the one-year storage of silage digestibility of fibers and dry matter is changed. Also, previous research shows that microorganisms of inoculant show activity in the stable phase of ensiling and also changing the amount and digestibility of protein, but it is unknown how they effect on fiber composition and digestibility. Therefore, the aim of this study is to determine the influence of inoculation and extended length of storage on content of fibers measured as a neutral detergent fiber (NDF) and *in vitro* digestibility of NDF and dry matter (DM) in the whole plant corn silage. In the study, the silage mass was divided into two parts, one treated with inoculant, second one was left untreated. Silage was sampled over a period of one year, with a total of eight sampling (0., 5., 15., 48., 98., 182., 274. and 364. days). In prepared samples, NDF content, *in vitro* digestibility of DM and NDF was determined after 24 and 48 hours in Daisy^{II} ANKOM incubator. Length of storage, inoculation and their interaction had a significant effect on NDF content. The results show that extended length of storing silage significantly influenced *in vitro* digestibility of dry matter and NDF while the addition of inoculant had no effect on digestibility of DM and NDF of whole plant corn silage.

Key words: corn, silage, NDF, digestibility, inoculant, storage

1. Uvod

Kukuruz (*Zea mays L.*) je žitarica koja se od svih najviše koristi u hranidbi životinja, također se koristi u prehrani ljudi te u proizvodnji bioetanolu (Grbeša, 2016) s ukupnom proizvodnjom od 1.037.791.518 tona u 2014. godini (FAOSTAT, 2016). Od ukupne proizvodnje 67% potroši se u hranidbi životinja, što znači da kukuruz podmiruje 33% energetske odnosno 13% proteinske potrebe svjetske animalne proizvodnje. Siliranjem cijele biljke kukuruza dolazi do očuvanja hranjivih tvari zelene mase kukuruzne biljke koja se koristi za siliranje (Grbeša, 2016). Silaža cijele biljke kukuruza važan je izvor vlakana, oni su glavni mikrobni fermentacijski supstrat buraga te opskrbljuju preživače energijom. Također, vlakna povećavaju aktivnost žvakanja, insalivaciju i pH buraga te na taj način održavaju zdravlje probavnog sustava. Vlakna se dijele na neutralna detergent vlakna (NDV) i kisela detergent vlakna (KDV) (Niwińska, 2012). NDV se probavlja u buragu i brzina digestije uvelike varira između različitih tipova silaža, dok se digestija vlakana povećava proporcionalno vremenu zadržavanja hrane u buragu (Da Silva i Santos, 2016). Predviđanje probavljivosti NDV-a potrebno je za poznavanje iskoristive energije iz krmnih smjesa za preživače. Metode koje se danas koriste u određivanju probavljivosti krmiva kod preživača su: *in vitro*, *in situ* i *in vivo* (Hoffman i sur., 2001). Dok je dobro poznat utjecaj količine i sastava vlakana na probavljivost obroka te njihova energetska i zdravstvena važnost, nije poznato da li se tijekom produljenog odležavanja silaže i uporabe inokulanta mijenja sastav NDV i probavljivost suhe tvari i vlakana. Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj inokulanta i vremena odležavanja na sadržaj neutralnih detergent vlakana i *in vitro* probavljivost NDV-a silaže cijele biljke kukuruza. Korištene metode za ispitivanje utjecaja su određivanje sadržaja NDV-a prema Van Soest i sur. (1991) i *in vitro* buražna probavljivost suhe tvari i NDV nakon 24 i 48 sati u Daisy^{II} ANKOM inkubatoru (Holden, 1999). Inkubacija od 24 sata predstavlja kraće zadržavanje hranjiva u buragu specifično za visokoproduktivne mliječne krave, dok je inkubacija od 48 sati specifična za manje intenzivnu proizvodnju mlijeka (Hoffman i sur., 2006).

1.1. Cilj istraživanja

Na temelju pregleda literature formirane su sljedeće hipoteze i cilj istraživanja:

- Produljeno vrijeme odležavanja silaže povećat će buražnu *in vitro* probavljivost suhe tvari i neutralnih detergent vlakana inkubiranih 24 i 48 sati.
- Dodatak komercijalnog inokulanta tijekom siliranja cijele biljke kukuruza povećat će buražnu *in vitro* probavljivost suhe tvari i neutralnih detergent vlakana inkubiranih 24 i 48 sati.

Temeljem postavljenih hipoteza, cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj komercijalnog inokulanta (Bio-Sil®; Dr. Pieper Technologie - und Produktentwicklung GmbH Wuthenow) i vremena odležavanja (0, 5, 15, 48, 98, 182, 273 i 364 dana) na sadržaj vlakana mjerenih kao neutralna detergent vlakna (NDV) i *in vitro* probavljivosti NDV i ST u silazama cijele biljke kukuruza.

2. Pregled literature

2.1. Građa i sastav kukuruza

Kukuruz je prosolika žitarica, sastoji se od korijena, stabljike, lista (klicin, pravi list i listovi omotača klipa), ženskih i muških cvjetova odnosno metlice i klipa, te ploda kojeg čini zrno. Visina stabljike na području Hrvatske kreće se oko 1 m do 1,5 – 2,5 m kod nekih hibrida u nizinskim područjima (Jurišić, 2008). Strukturni ugljikohidrati biljke kukuruza većinom su iz stabljike i listova biljke, a manji dio iz zrna (Roth i sur., 2001). Kukuruzno zrno sastoji se od osnovnih morfoloških dijelova: endosperma, klice, omotača i drške zrna. Njihovi udijeli uvelike utječu na nutritivne vrijednosti zrna. Prema omjeru brašnostoga i rožnatog endosperma, kukuruzno zrno dijeli se na tvrdunce, polutvrdunce, kvalitetne zubane i zubane. Omotač se sastoji uglavnom (90%) od vlakana koje štite unutrašnjost zrna od mehaničkih i bioloških oštećenja. Frakcije vlakana u zrnu kukuruza su takve da je 9,07% NDV-a i 2,78% KDV-a (Grbeša, 2016).

2.2. Strukturni ugljikohidrati

Izvor energije za proizvodna goveda su strukturni ugljikohidrati čije frakcije karakteriziraju neutralna detergent vlakna (NDV) i kisela detergent vlakna (KDV). NDV sačinjavaju biljni strukturni ugljikohidrati celuloza, hemiceluloza i lignin dok se KDV razlikuje po isključenju hemiceluloze iz sastava. Strukturni ugljikohidrati glavni su mikrobní fermentacijski supstrat buraga, također povećavaju aktivnost žvakanja, insalivinaciju i dosljedno tome pH buraga (Niwińska, 2012). Probava vlakana u buragu rezultat je zajedničkih aktivnosti celulitičkih i necelulitičkih mikroorganizama, gdje dolazi do razgradnje staničnih struktura frakcija vlakana vezanjem bakterijskih vrsta na vlakna. Fermentacijom vlakana u buragu oslobađaju se hlapljive masne kiseline koje su izvor energije za organizam (Da Silva i Santos, 2016). Mjerenje sastava NDV i KDV je prema metodama koje je opisao Van Soest i sur. (1991.) dok se za određivanje probavljivosti koriste *in vitro*, *in situ* i *in vivo* metode (Hoffman i sur., 2001)

Celuloza je u vodi netopljivi β -glukan sastavljen od linearne molekule d-anhidroglukopiranoznih ostataka povezanih s α -(1 \rightarrow 4) vezom (Da Silva i Santos, 2016). Proces razgradnje uključuje aktivnost endoglukanaze, egzoglukanaze, stanobiohidrolaze i glukozidaze koje djeluju na pucanje krajeva lanaca celuloze, oslobađajući celobiozu ili glukozu (Niwińska, 2012).

Hemiceluloza se sastoji od kompleksnih heteropolimera. Heteropolimeri se znatno razlikuju po primarnom sastavu, supstituciji i stupnju razgranatosti, i mogu se grupirati u četiri grupe: ksilani, ksiloglukani, manani i mješoviti spojevi, β -glukani. Glavni sastojak važan za proizvodnju silaže je ksilan koji čini oko 30-35% materijala staničnog zida biljaka

(Da Silva i Santos, 2016). Buražna probavljivost hemiceluloze varira od 16 do 90%, ovisno o sadržaju buraga (Niwińska, 2012).

Lignin je složeni fenolni polimer koji je neprobavljiv za mikroorganizme buraga, te njihova koncentracija ograničava probavljivost strukturnih ugljikohidrata (Van Soest, 1994). Djeluje poput štita u stanicama biljaka tako da ne može doći do hidrolize polisaharida. Sastav i količina lignina u biljkama koristi se kao predindikator probavljivosti organske tvari i suhe tvari kod preživača (Da Silva i Santos, 2016). Jake kovalentne veze između lignina i polisaharida stanične stijenke smanjuju njihovu dostupnost i samim time aktivnost mikrobne hidrolaze (Niwińska, 2012). Povezivanje lignina s polisaharidima staničnih stijenki opisano je kao dodatni mehanizam koji ograničava probavljivost vlakana (Da Silva i Santos, 2016).

Postoje sljedeće tri skupine metoda za određivanje vlakana i njihovih sastojaka:

- Metoda određivanja sirovih vlakana (Weende metoda),
- Detergent ili Van Soestova metoda (neutralna detergent vlakna - NDV, kisela detergent vlakna - KDV i kiseli detergent lignin - KDL),
- Enzimatsko gravimetrijska metoda ili ukupna obročna vlakna.

2.3. Važnost probavljivosti vlakana

Vlakna igraju važnu ulogu u hranidbi preživača. Sam fizički učinak NDV-a pozitivno je povezan sa zdravljem probavnog sustava preživača, pošto pozitivno djeluje na žvakanje, pH buraga i sadržaj mliječne masti. Istraživanja su pokazala da će krave u laktaciji unijeti više ST hranom i proizvesti više mlijeka ako se hrane krmom s većim udjelom probavljivog NDV-a (Hoffman i sur., 2001). Dobro je utvrđeno da vlakna iz voluminoznih izvora izazivaju salivaciju i pojačano žvakanje, odnosno neodgovarajuća vlakna hrane smanjuju aktivnost žvakanja, insalivaciju i dosljedno tome smanjuju pH buraga te mogu uzrokovati acidozu buraga i laminitis (Da Silva i Santos, 2016). Oba i Allen (1999) pronašli su vezu između probavljivog NDV-a i životinjskih performansi te su izvijestili da je povećanje probavljivog NDV-a u krmi za samo jednu jedinicu nakon 30 sati *in vitro* inkubacije povezano s porastom od 0,17 kg d⁻¹ unosa ST i 0,23 kg d⁻¹ mliječnosti. Korištenje kvalitetne silaže u sustavima proizvodnje mlijeka može smanjiti fizičko popunjavanje buraga te omogućiti stoci da konzumiraju više hrane i tako proizvode više mlijeka.

Mehanizam probave vlakana usko je povezan s buragom. Potencijalno probavljivi NDV i brzina digestije uvelike variraju između i unutar različitih vrsta silaže, dok je stopa prolaza vlakana prvenstveno pod utjecajem životinje, gdje se probava vlakana povećava proporcionalno vremenu zadržavanja hrane u buragu. Čak i u optimalnim uvjetima, probavljivost NDV-a u buragu često je manja od 50%, a poboljšanje razgradnje vlakana moglo bi omogućiti stoci da konzumira više hrane i time povećava proizvodnju mlijeka. Odabir krmne smjese s većim udjelom probavljivog NDV-a može biti praktičan pristup prema

povećanju probavljivih ugljikohidrata hrane te unosu ST hrane kod preživača (Da Silva i Santos, 2016).

Nedavno je *in vitro* probavljivost NDV-a (engl. *In vitro neutral detergent fibre digestibility*, IVNDFD) identificirana kao važan parametar kvalitete koji je vrlo varijabilan između kukuruznih silaža i ima konzistentan učinak na produktivnost mliječnih krava. Prema Oba i Allen (1999), nisko proizvodne krave imale su manji unos hrane i prinos mlijeka hranjene kukuruznom silažom s većim IVNDFD dok su visoko proizvodne krave odgovorile povećanim unosom i prinosom mlijeka. S obzirom na višu cijenu kukuruzne silaže s poboljšanim IVNDFD mora postojati određeni odgovor u obliku pozitivnih performansi životinja kako bi se ulaganje isplatilo, te bi se ono trebalo nuditi visoko proizvodnim kravama koje će najviše imati koristi (Oba i Allen, 1999).

Nacionalno vijeće za istraživanje SAD-a (NRC, 2001) potvrdilo je da obroci mliječnih krava trebaju imati najmanje 25% NDV-a, od čega 18,7% mora biti iz voluminoznog dijela obroka za adekvatno zdravlje buraga. Udio vlakana u obroku preko 44% može također imati negativne učinke na unos i probavljivost hrane. Općenito, minimalni sadržaj NDV-a koji se preporučuje za mliječne krave ovisit će o hranjivosti NDV-a, fizičkoj učinkovitosti vlakana i izvoru vlakana (Da Silva i Santos, 2016).

2.4. Metode određivanja probavljivosti vlakana u buragu

Probava vlakana smještena je u buragu, gdje mikroorganizmi buraga razgrađuju vlakna hrane. Buražna probavljivost bitan je faktor prepoznavanja kakvoće krme. Predviđanje IVNDFD je potrebno za poznavanje iskoristive energije iz krmnih smjesa. Metode koje se danas koriste u određivanju probavljivosti krmiva kod preživača su: *in vitro*, *in situ* i *in vivo* (Hoffman i sur., 2001).

In vitro metoda mjeri probavljivost krme prema Goering i Van Soest (1970). Temelji se na oponašanju uvjeta iz buraga, gdje se sušeni i mljeveni uzorci u poroznim F57 vrećicama (veličina pora 25 µm) (ANKOM) stavljaju u buražnu tekućinu i pufere te se inkubiraju na postavljeno vrijeme (24 ili 48h) u Daisy^{II} ANKOM inkubatoru (Allen, 2000, Holden, 1999). Inkubacija od 24 sata povezuje se s visokoproduktivnim mliječnim kravama, dok je inkubacija od 48 sati specifična za manje intenzivnu proizvodnju mlijeka (Hoffman i sur., 2006). Tijekom godina metoda se nije puno mijenjala, izuzmemo li vrijeme inkubacije, koje se smanjilo s 48 ili 30 sati na 24 sati (Hoffman i sur., 2001). DAISY^{II} je učinkovit sustav mjerenja *in vitro* probavljivosti i daje nam podatke učinkovitije od tradicionalnih metoda [metode prema Tilly i Terry (1963)], te predstavlja značajnu prednost za analizu krmnih smjesa, žitarica i miješanih uzoraka (Holden, 1999). Analiziranje IVNDFD krmnih smjesa dodatni je alat i za bolje predviđanje kakvoće krmne smjese i korištenja krmnih smjesa od strane mliječnih goveda (Kendall i sur., 2009). Mjerenje *in vitro* probavljivosti ST i NDV-a je opsežno korišteno za analizu stočne hrane zbog visokog stupnja korelacije s *in vivo* probavljivosti (Holden, 1999).

In situ metoda određuje buražnu probavljivost na temelju inkubacije pripremljenih uzoraka u fistuliranim kravama. Uzorci se važu u najlonskim, Dacron vrećicama te umeću u burag krave kroz ruminalnu kanulu. Količina NDV-a prije inkubacije uspoređuje se s preostalom količinom NDV-a nakon inkubacije i probavljivosti NDV-a (Hoffman i sur., 2001).

In vivo metodom dobivaju se najprecizniji rezultati kod određivanja probavljivosti hranjivih tvari. Probavljivost se određuje prema sadržaju neprobavljivih tvari u fecesu, čime dobivamo rezultat probavljivosti cijelog probavnog sustava, a ne samo buraga. Iako najpreciznija metoda, ona je najskuplja i najduže traje te se češće koriste *in vitro* metode. Koeficijenti probavljivosti *in vitro* nisu toliko precizni i često su viši od *in vivo*, jer u buragu često nije optimalna okolina, te zadržavanje tvari u buragu često varira što *in vivo* metode zanemaruju (Allen, 2000).

2.5. Silaža cijeke biljke kukuruza

Siliranje je proces korišten diljem svijeta kao metoda očuvanja hranjivih tvari vlažnih krmiva (Weinberg i Muck, 1996). Silaža cijeke biljke kukuruza dominantna je hrana u hranidbi goveda u RH te brojnim drugim državama. Sadrži najviše energije ($> 6,55$ MJ/kg ST) u obliku škroba čemu pridonose visoki udijeli zrna u silaži (67%) te visoku konzumaciju zbog najmanje količine vlakana (45% NDF u ST) među voluminoznim krmivima u generativnom stadiju rasta. Podmiruje u obroku mliječnih krava 50 – 80% energetskih, 25 – 40% proteinskih potreba, te 60% potreba za vlaknima. Također, kukuruz ima visoke i stabilne prinose zelene mase kao i suhe tvari, te u odnosu na druga voluminozna krmiva, silaža cijeke biljke kukuruza odlikuje se lakšom i fleksibilnijom proizvodnjom i lakšim siliranjem (Grbeša, 2016).

2.5.1. Proces siliranja

Siliranje je metoda koja se temelji na prirodnoj anaerobnoj fermentaciji tvari tijekom koje bakterije mliječne kiseline (BMK) razlažu vodotopive ugljikohidrate (CH) na organske kiseline. Fermentacija snižava pH koji inhibira štetne aerobne bakterije te zelena masa ostane očuvana u obliku silaže (Weinberg i Muck, 1996). Četiri su faze procesa siliranja:

- Aerobna faza, u ovoj fazi kisik se još uvijek nalazi u dijelovima biljke a pH iznosi 6,0 – 6,5. Zbog ovakvih uvjeta omogućeno je stanično disanje biljaka i aktivnosti proteaza te aerobnih i fakultativno aerobnih mikroorganizama, poput gljivica, kvasaca i enterobakterija,
- Faza fermentacije, koja može trajati od nekoliko dana do nekoliko tjedana. U ovoj fazi silaža je anaerobna te se stvaraju uvjeti za razvijanje BMK koje postaju dominantne u

mikrobnoj populaciji, a započinje i proizvodnja mliječne kiseline koja smanjuje pH silaže na 3,8 – 5,0,

- Stabilna faza, faza u kojoj dolazi do relativno malih promjena u silažnoj masi,
- Faza izuzimanja silaže, kada se otvaraju silosi i silaža se izlaže kisiku, što omogućuje aktiviranje aerobnih mikroorganizama što uvelike utječe na kvarenje silaže (Weinberg i Muck, 1996).

2.6. Utjecaji na kvalitetu silaže

Kvalitetna silaža je higijenski ispravna, s niskim pH i pogodnom fermentacijom mliječne kiseline što sprječava daljnju mikrobnu aktivnost i kvarenje. Loše fermentirana silaža može rezultirati smanjenim unosom hrane, smanjenim unosom proteina te shodno tome sniženom animalnom proizvodnjom (Kaiser i sur., 2004). Mnogo je čimbenika koji utječu na kvalitetu silaže i tijek fermentacije. To su vrsta krme, tip silaže, stadij zrelosti zelene mase, visina rezanja krme, uzgojne metode, te aditivi za silose (Da Silva i Santos, 2016). Prema Kung (2001) za proizvodnju dobre silaže visoke kvalitete potrebno je:

- Brzo uklanjanje zraka (kisika)
- Brzo stvaranje mliječne kiseline kako bi se snizio pH silaže
- Održavanje anaerobnih uvjeta tijekom čuvanja te sprečavanje dubljeg prodora kisika u silažnu masu tijekom izuzimanja silaže

Kvalitetna i higijenski ispravna silaža dobivena brzim padom pH inhibirat će rast aerobnih mikroorganizama poput enterobakterija i klostridija, a poželjna kvaliteta održat će stabilnost silaže od onog trenutka kada je zrak u potpunosti uklonjen iz silažne mase.

Održavanje kvalitete silaže provodi se kontrolom svake faze postupka siliranja. Odgođeno zatvaranje silaže omogućuje produljenu aerobnu fazu koja rezultira smanjenjem vodotopivih ugljikohidrata dostupnih za fermentaciju i proizvodnju mliječne kiseline. Na taj način se povećavaju gubici hranjivih tvari, koji su još veći kod silaža s nižim udjelom suhe tvari jer dolazi do smanjenja hranjivosti silaže, koja je još veća kod vlažnijih krmiva. Previše vlažna krma s visokim pH omogućuje aktivaciju klostridija koje fermentiraju mliječne kiseline (MK) i aminokiseline, taj proces naziva se "sekundarna ili klostridijska fermentacija". Ovakav proces dovodi do gubitka ST, hranidbene vrijednosti, te može ozbiljno naštetiti zdravlju životinja, pošto neke plijesni mogu proizvesti mikotoksine (Weinberg Muck, 1996).

Silaže sadrže kemijske tvari nazvane puferi koji se odupiru promjeni pH, a sam puferni kapacitet u silažama oslanja se uglavnom na sadržaj organskih kiselina i njihovih soli. Puferi neutraliziraju neke kiseline, čija visoka proizvodnja može dovesti do produkcije nepoželjnih bakterija, stoga u silažama s visokim pufernim kapacitetom postoji veća mogućnost za lošu fermentaciju. Puferni kapacitet ovisi o vrsti zelene mase, stadiju razvoja biljke, gnojidbi te prosušavanju mase (Kaiser i sur., 2003). Tablica 1. prikazuje produkte fermentacije silaže te njihove pozitivne i negativne utjecaje.

Tablica 1. Krajnji produkti fermentacije silaže i njihov utjecaj

Produkti fermentacije	Utjecaj
pH	-Niski pH inhibira bakterijsku aktivnost
Mliječna kiselina	-Inhibira bakterijsku aktivnost smanjujući pH
Octena kiselina	-U suvišku se može pojaviti kod nepoželjnog tijeka fermentacije, - Inhibira kvasce zaslužne za aerobno kvarenje
Maslačna kiselina	-Povezana s degradacijom proteina, stvaranjem toksina i velikim gubitcima ST i energije silaže
Etanol	-Indikator nepoželjne fermentacije, metaboličke aktivnosti kvasaca i gubitak ST

Izvor: Kung, L. (2001).

2.7. Utjecaji na hranjivost silaže

Hranjivost silaže kukuruza podređena je različitim utjecajima, a među njima tri najbitnija čimbenika u proizvodnji su:

- Stadij zrelosti biljke
- Kvaliteta siliranja i vrijeme korištenja
- Hibrid i tip kukuruza

Dakako, sama uspješnost siliranja cijele biljke kukuruza ovisi i o duljini sjeckanja, sadržaju suhe tvari, dovoljnoj količini vodotopljivih šećera i niskom pufernom kapacitetu zelene mase, što sve zajedno omogućuje brzo i potpuno istiskivanje zraka i stvaranje mliječne kiseline (Grbeša, 2016).

2.7.1. Stadij zrelosti biljke i suha tvar

Stadij rasta biljke kukuruza utječe na sadržaj energije i vlakana jer lignifikacija biljke raste sa starošću biljke. Također, stabljika sadrži više lignina od lista, te je dobro poznato da lignin snižava probavljivost vlakana i dostupnost energije (Niwińska, 2012). Najbolji rezultati dobiveni su pri sadržaju suhe tvari od 32-35 % zelene mase, kada biljka sadržava isto toliko škroba jer je zrno u tjestastoj ili voštanoj zriobi. Navedeni sadržaj suhe tvari kompromis je između prinosa zrna i dobre probavljivosti stabljike i lista, te dobre silažnosti biljke što rezultira viskom konzumacijom energije iz silaže kukuruza a time i višom mliječnošću krava.

Pri višim sadržajima suhe tvari (> 35%) znatnije raste caklavost zrna i lignifikacija vlakana pa opada hranjivost silaže. Porast sadržaja ST utječe na pH tako da ga smanjuje i to tako da za svakih 1% se smanjuje pH za 0,016. IVNDFD-a silaže kukuruza snižava se s porastom sadržaja suhe tvari sa 72% u mliječno-tjestastoj na 42% probavljivosti u potpuno caklastoj zriobi zrna (Grbeša, 2016).

Kod silirane mase vlažnih krmiva previsok udio ST smanjuje aktivnost vode i pH, a stopa rasta BMK pada, stoga se uzima da je gornja granica podobna za rast BMK u čistim kulturama 60-75% ST (Weinberg i Muck, 1996). Sadržaj ST ima utjecaj na siliranje krme te nizak udio ST također nije podoban te s nižim udjelom šećera povećava mogućnost klostridijske fermentacije te manji unos ST kod životinja (Kung, 2001).

2.7.2. Strukturni ugljikohidrati

Biljni strukturni ugljikohidrati utječu na kvalitetu silažne mase (Da Silva i Santos, 2016). Otprije je poznata važnost vlakana za zdravlje probavnog sustava preživača i proizvodnju mliječne masti, no visoki udijeli NDV-a smanjuju konzumaciju silaže, dok visoki udio KDV-a smanjuje probavljivost silaže kukuruza (Grbeša, 2016). Kukuruzna silaža ima širok raspon IVNDFD-a, no nisu uobičajene ekstremne vrijednosti pošto se kukuruz za silažu sakuplja i pohranjuje unutar relativno uskog raspona zrelosti (Hoffman i sur., 2001). Mliječne krave hranjene silažom kukuruza s višim sadržajem IVNDFD-a pokazale su višu konzumaciju ST i imale su veću mliječnost. Za svako povećanje IVNDFD za 1% unos ST povisuje se za 0,17 kg/d, kao i proizvodnja mlijeka za 0,23 kg/d (Da Silva i Santos, 2016).

2.7.3. Tip i hibrid kukuruza

Poznato je da hibridi pokazuju varijacije u ST i probavljivosti vlakana (Roth i Heinrichs, 2001). Hibridi se razlikuju po udjelu i buražnoj probavljivosti škroba i vlakana, a time i energetske vrijednosti. Uzmemo li to u obzir, logično je da se između krava hranjenih različitim hibridima nalaze razlike u mliječnosti. Tako razlike u mliječnosti mogu dosežati i 1-3 kg/d, konzumacija suhe tvari 1 kg/d, a prirasti junadi 100 g/d kada se hrane jednakim udjelom različitih hibrida (Grbeša, 2016). Hibridi se razlikuju (0,92 MJ/kg ST) u sadržaju neto energije za proizvodnju mlijeka, što je dovoljno za proizvodnju 0,3 kg mlijeka (Grbeša, 2016). Najbolji primjer su smeđi (BM3) hibridi kukuruza koji sadrže veće udjele NDV-a (Hoffman i sur., 2001). U prijašnjim istraživanjima spoznata je i veća učinkovitost tvrdunaca u hrani za životinje pa tako i u silaži, dok u nekim istraživanjima nije bilo razlike, čak su prinosi bili niži nego kod zubana (Roth i Heinrichs, 2001).

2.7.4. Odležavanje silaže

Sastav silažne mase se mijenja u prva dva mjeseca, te nakon toga ostaje stabilan. Fermentacijom ugljikohidrata u prva dva mjeseca stajanja silaža sintetiziraju se organske kiseline, u prvom redu mliječna, koje stabiliziraju silažnu masu (McDonald i sur., 1991). Naspram predodžbi da se silaža ne mijenja nakon 2 do 6 tjedana čuvanja zabilježene su mikrobne aktivnosti kod produženog vremena odležavanja silaže (Kleinschmit i Kung, 2006). Odležavanje silaže može utjecati na hranidbenu vrijednost silaže. Tako je kroz različita znanstvena istraživanja pokazano da se produženim odležavanjem silirane mase znatno smanjuje udjel zeina/škroba i povisuje probavljivost škroba (Grbeša, 2016). Prema Der Bedrosian i sur. (2012) s produženim vremenom odležavanja vlakna silaže se također mijenjaju; tome je zaslužna hidroliza hemiceluloze zbog povećane kiselosti jer je zabilježeno povećanje udjela mliječne kiseline i za 140% između 45 – 360 dana skladištenja. Ovime starija silaža postiže višu energetska vrijednost, ali se povisuje opasnost od učestalosti acidoze, dolazi do pada udjela KDV-a, a time je i veća buražna probavljivost vlakana, odnosno veći udio IVNDFD-a (Grbeša, 2016). Međutim, rezultati istraživanja Morrison (1979) pokazuju da skladištenje od 150 dana nije utjecalo na razgradnju lignina, kao ni celuloze, no zabilježen je sniženi sadržaj hemiceluloze za 15%. Der Bedrosian i sur. (2012) su također zabilježili da produženo odležavanje silaže nije imalo utjecaj na IVNDFD-a između 45 – 270 dana, no zapaženo je povećanje udjela ST kod produljenog odležavanja. Najveća *in vitro* probavljivost vlakana (veća od 5%) i škroba (3%) spram zelene mase prije siliranja je nakon 3-6 mjeseci odležavanja, te je tada najpogodnije korištenje silaže (Grbeša, 2016).

2.7.5. Sadržaj vodotopivih ugljikohidrata

Uspješnost siliranja uvelike ovisi o fermentaciji vodotopivih ugljikohidrata (CH) u mliječnu kiselinu pomoću BMK. Količina CH silaži ovisi o vrsti zelene mase, stadiju rasta biljke, gnojidbi, dijelu dana, kultivaru i temperaturi. CH čine glukoza, fruktoza, saharoza i fruktani. Udio CH-a trebao bi biti > 2,5% u svježoj zelenoj masi, ako je to nemoguće postići, korištenje aditiva može smanjiti loš tijekom fermentacije. Žitarice imaju visok udio CH-a u vegetativnoj fazi rasta. Starenjem biljke i povećanim udjelom zrnja povećava se i udio škroba, a CH-a opada. BMK ne mogu fermentirati škrob, iako je moguće prethodno pretvaranje škroba u CH uz pomoć biljnih enzima (Kaiser i sur., 2003). U pravilu, silaža u odnosu na zelenu biljku kukuruza sadržava gotovo deseterostruko manje vodotopivih šećera (7% : 0,7%), oko 4% manje vlakana (NDV i KDV) i sirovog proteina, te samo 1,0 – 1,5% manje škroba. Probavljivost škroba zrna u silaži kukuruza raste s vlažnosti, finoćom mljevenja (čestice manje od 4,75 mm), a opada sa udjelom zeina (Grbeša, 2016).

2.8. Aditivi

Aditivi omogućuju manji gubitak hranjivih tvari silaže, poboljšavaju stabilnost silaže, koriste se kod niskog sadržaja CH-a te smanjuju mogućnost kvarenja silirane mase (McDonald, 1991., Kung, 2001). Potrebno je razumjeti da aditivi nisu zamjena za loše siliranje. Mogu se grupirati u pet grupa prema načinu djelovanja:

- Stimulatori fermentacije - pokretači fermentacije: najčešće šećeri, melasa ili nusprodukti prehrambenih proizvodnja poput pulpa citrusa, zatim enzimi i inokulanti.
- Inhibitori fermentacije - koriste se različite kiseline (mravlja kiselina) kao i neke soli (formalin, formaldehid, natrijev nitrat).
- Inhibitori aerobnog kvarenja - kiseline, soli kiselina i ostali kemijski aditivi, inokulanti (homofermentativni BMK), neproteinski izvori dušika (urea).
- Nutrijenti - zrnje žitarica, melasa, neproteinski izvori dušika, minerali.
- Inhibitori efluenta (otpadnih voda) - smanjuju višak vlage kod silaža sa ST manjom od 25 – 20%.

Aditivi se mogu koristiti kod problema pri procesu siliranja, za poboljšanje fermentacije, za smanjenje gubitaka tijekom siliranja, te za poboljšanje hranidbene vrijednosti silaže (Kaiser i sur., 2003). Pozitivni učinci korištenja aditiva su: 1) mogućnost poboljšanja animalne proizvodnje, 2) povećanje sadržaja ST i smanjenje gubitka hranjivih tvari, te 3) omogućuju poboljšanje aerobne stabilnosti (Kung, 2001).

Aditivi mogu biti kemijski i biološki te je poznata njihova uloga stvaranja adekvatnih uvjeta za fermentaciju. Biološki aditivi su oni koji sadrže bakterijske inokulante i enzime. Bakterijski inokulanti imaju prednosti nad kemijskim aditivima. Bakterijski inokulanti su neopasni, jednostavni za uporabu, ne stvaraju koroziju na poljoprivrednim strojevima, ne zagađuju okoliš, i smatraju se prirodnim proizvodima. Inokulanti silaže sadrže uglavnom bakterije mliječne kiseline i takvi su postali dominantni u uporabi diljem svijeta, ne samo zbog praktičnosti i sigurnosti, nego i zato što kontroliraju mikrobiološku aktivnost tijekom fermentacije silaže. Njihova funkcija je da brže i učinkovitije iskorištavaju CH, što rezultira intenzivnom proizvodnjom MK i bržim smanjenjem pH (Weinberg i Muck, 1996). Mliječno-kisele bakterije stvaraju poželjnu mliječnu kiselinu, koja povećava kiselost (pad pH) te otapa zeine koji smanjuju probavljivost škroba (Grbeša, 2016). U proizvodnji silaže cijele biljke kukuruza prema Johnson (2002) inokulacija s BMK poboljšala je stabilnost silaže više od stadija zrelosti i mehaničke prerade.

Kaiser i sur. (2003) navode da inokulanti imaju pozitivan učinak na performanse životinja, čak i kada sami inokulanti nisu bili potrebni za poboljšanje siliranja. Istraživanje Oliveira i sur. (2017) prikazuje povišenu mliječnost (0,37 kg/d), sadržaj mliječne masti u mlijeku i proteina mlijeka kod mliječnih krava hranjenih silažom s dodatkom inokulanta. Stoga je poznato da je dodavanje inokulanata mliječno-kiselih bakterija na suhu masu za siliranje poželjno kao nutritivni dodatak.

2.8.1. Inokulanti

Korištenje BMK kultura radi poboljšanja fermentacije silaže razvio se početkom prošlog stoljeća. U samom početku uporabe inokulanata, oni nisu bili uspješni. Često tako dodani inokulant nije imao dovoljno živih bakterija. Tek je s razvitkom tehnologija sušenja, zamrzavanjem i kapsuliranjem uporaba inokulanata bila uspješna. U silaži, inokulanti trebaju biti brzog rasta, trebaju biti homofermentativni i proizvesti maksimalne količine MK u kratkom vremenu, trebaju biti tolerantni na kiseline i sposobni rasti u materijalu visokog udjela ST i na temperaturama do 50 °C (Weinberg i Muck,1996). Inokulante se dodaje u svježu zelenu masu da bi se poboljšala kvaliteta silaže. Prve studije o dodavanju inokulanta sadržavale su homolaktičke bakterije BMK kao što je *Lactobacillus plantarum*, koje ubrzavaju pad pH silaže. One inhibiraju rast kvasaca, bakterija i plijesni kvarenja, kao i disanje biljnih stanica, te održavaju potrebnu razinu šećera za fermentaciju (Da Silva i Santos, 2016). Tijek fermentacije u silaži s dodanim inokulantom je: brži pad pH vrijednosti, niži krajnji pH, veći omjeri laktata i acetata (dobiveni povećanjem mliječne i smanjenjem proizvodnje octene kiseline), niže razine amonijaka i dušika i 1–2% poboljšanje u sadržaju ST (Weinberg i Muck,1996). Značajan utjecaj BMK inokulanta na IVNDFD – 48 sati, sadržaj NDV-a i sirovih proteina nije zabilježen u istraživanju Oliveira i sur. (2017), međutim, tijekom fermentacije je ostao uobičajen, stabilnost silaže povećana te su silaže s BMK dodatkom imale pozitivan utjecaj na proizvodna svojstva životinja.

Dodavanja inokulanata BMK je dodavanje homofermentativnih BMK (hoBMK) koje mogu dominirati fermentacijom i povišiti kvalitetu silaže. Najpoznatije hoBMK koje se koriste kao dodaci silažama su *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentacaceus*, i *Enterococcus faecium*. Inokulanti sadrže jednu ili kombinaciju više homofermentativnih BMK kako bi održavali stabilnost silaže dominacijom nad fermentacijom (Kung, 2001).

Lactobacillus plantarum, kvalitetni je inokulant koji zadovoljava kriterije za uspješnu proizvodnju silaže. Ovaj mikroorganizam je često izoliran iz silaža. U inokulantima je najčešće miješan sa sojevima BMK koji su aktivniji u ranijim fazama fermentacije kada je pH još uvijek 5,0 te tada daje bolje rezultate. BMK koji se najčešće koriste zajedno s *L. plantarum* su *Enterococcus faecium*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* i *P. pentosaceus*. U nekim se slučajevima dodaju jednostavni šećeri koji služe kao neposredni supstrat, ili enzimi poput amilaze. Stope inokulacije BKM, navedene od strane proizvođača, obično su 10^5 - 10^6 CFU/g, što je često dovoljno za inokulante BMK da prerastu epifitske BMK i postanu prevladavajuća populacija u silaži (Weinberg i Muck,1996). U nastavku se nalazi tablica tipova inokulanta te njihovi utjecaji (Tablica 2.).

Tablica 2. Tipovi i utjecaji inokulanta.

Inokulant	Tip inokulanta	Utjecaj	Produkt fermentacije
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bakterija mliječne kiseline, homolaktička	- ubrzana proizvodnja MK - relativna tolerancija na kiselost	Mliječna kiselina
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. cerevisiae</i>	BMK, homolaktička	- brza proizvodnja MK - brži rast od <i>Lactobacillus</i> sp - dobro podnošenje nižih temperatura	Mliječna kiselina
<i>Enterococcus faecium</i>	BMK, homolaktička	- brza proizvodnja MK - brži rast od <i>Lactobacillus</i> sp	Mliječna kiselina
<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>P. jensenii</i>	Propionibakterija	- proizvodnja antifungalnih tvari	Propionska kiselina, Octena kiselina, CO ₂
<i>Lactobacillus buchneri</i>	BMK, heterolaktička	- proizvodnja antifungalnih tvari	Mliječna kiselina, octena kiselina, propandiol, CO ₂

Izvor: Kung, L. (2001).

3. Materijali i metode

Kako bi se ispitao utjecaj produljenog vremena odležavanja silaže i inokulanta na promjene *in vitro* buražne probavljivosti vlakana u silažama cijele biljke kukuruza, protokol je uključivao hibrid kukuruza Bc 462 (polutvrđunac) čije je sjeme dobiveno od sjemenarske tvrtke Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb. Inokulant Bio-Sil® (Dr. Pieper Technologie - und Produktentwicklung GmbH, Wuthenow, Njemačka) dobiven je od tvrtke Fanon d.o.o. Petrijanec. Znanstveno istraživanje provedeno je u Zavodu za hranidbu životinja i Zavodu za specijalnu proizvodnju bilja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kukuruz je uzgojen na testnom polju Maksimir Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja. Priprema silaža te produljeno vrijeme odležavanja silaže, kao i kemijske analize silaža odrađene su u Zavodu za hranidbu životinja.

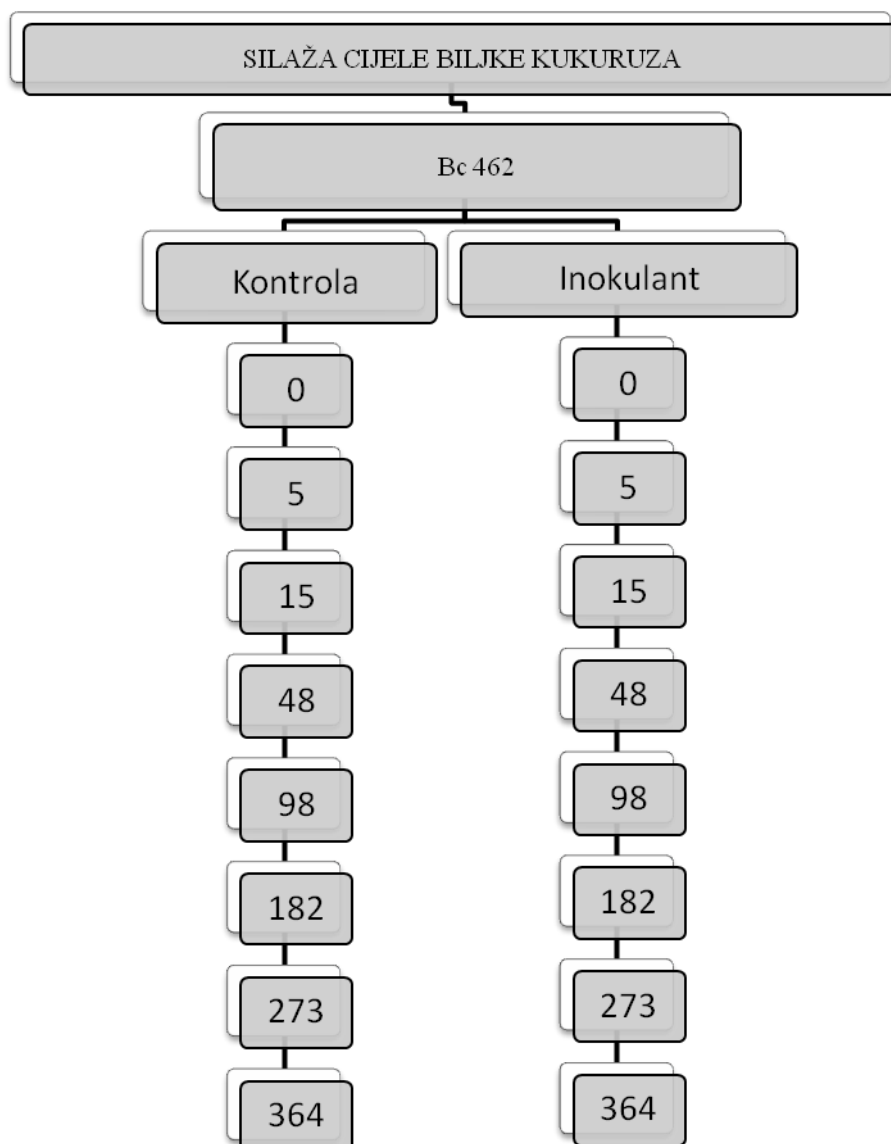
3.1. Priprema silaže

Poljski dio pokusa proveden je na pokušalištu Maksimir Agronomskog fakulteta u Zagrebu Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja tijekom vegetacijske sezone 2013. godine. Usjev hibrida kukuruza Bc 462 je proizveden u uvjetima intenzivne agrotehnike dok je pokusni plan na polju bio postavljen kao split-plot plan u pet repeticija.

Prilikom pripreme silaže ručno su ubrane cijele biljke kukuruza u fazi mliječno voštane zriobe. Cijele biljke kukuruza svakog ponavljanja isjeckane su i silirane tako da je masa svake repeticije podijeljena na dva jednaka dijela na koje su primijenjeni različiti tretmani, zatim su uzorci spremljeni u vakuum vrećice (Status, 280 x 360 mm, 25 set, Status d.o.o. Karlovac) koje su vakuumirane na uređaju za vakuumiranje i varenje (SmartVac, Status d.o.o. Karlovac). Poželjno je postići što kraću aerobnu fazu siliranja, te se samim vakuumiranjem inhibira prva aerobna faza siliranja. Naime duga aerobna faza ima negativne efekte na kvalitetu silaža jer potiče rast nepoželjnih aerobnih mikroorganizama te gubitak hranjivih tvari (McDonald i sur., 1991).

Prvi tretman je pripremljena otopina Bio-Sil® inokulanta s liofiliziranim kulturama *Lactobacillus plantarum* 8862 i 8866 (DSM, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture* GmbH, Braunschweig, Njemačka) u koncentraciji 300.000 CFU/g svježe mase prema uputama proizvođača. Drugi dio mase siliran je bez dodataka inokulanta.

Silaže su uzorkovane u periodu godine dana siliranja, točnije 0., 5., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan (Slika 3.1.1.). Tijekom siliranja silaže su stajale na sobnoj temperaturi (od 20 do 25 °C). Nakon uzimanja uzoraka, svi uzorci su pospremljeni i čuvani na -20 °C do kemijskih analiza.



Slika 3.1.1. Shema ispitivanih silaža cijele biljke kukuruza hibrida Bc 462 siliranih s različitim tipovima dodataka, dva dodataka silaži: 1. Inokulant i 2. kontrolne silaže bez dodataka, s obilježenim vremenskim točkama uzrokovanja: 0., 5., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan).

Izvor: Vlastiti izvor

3.2. Priprema laboratorijskog uzorka

Uzorci silaže cijele biljke kukuruza odmrznuti su te prosušeni na temperaturi od 60 ± 2 °C kroz 24 sata u sušioniku (INKO sušionik, INKOLAB d.o.o., Hrvatska). Prosušeni uzorci su podijeljeni na dva dijela, gdje je jedan dio samljeven i homogeniziran na mlinu za finu meljavu (Cyclotec 1093, Tecator, Švedska) na veličinu čestica ≤ 1 mm a drugi dio na veličinu čestice ≤ 2 mm (Cemotec 1090, Tecator, Švedska). Svi samljeveni uzorci svih repeticija

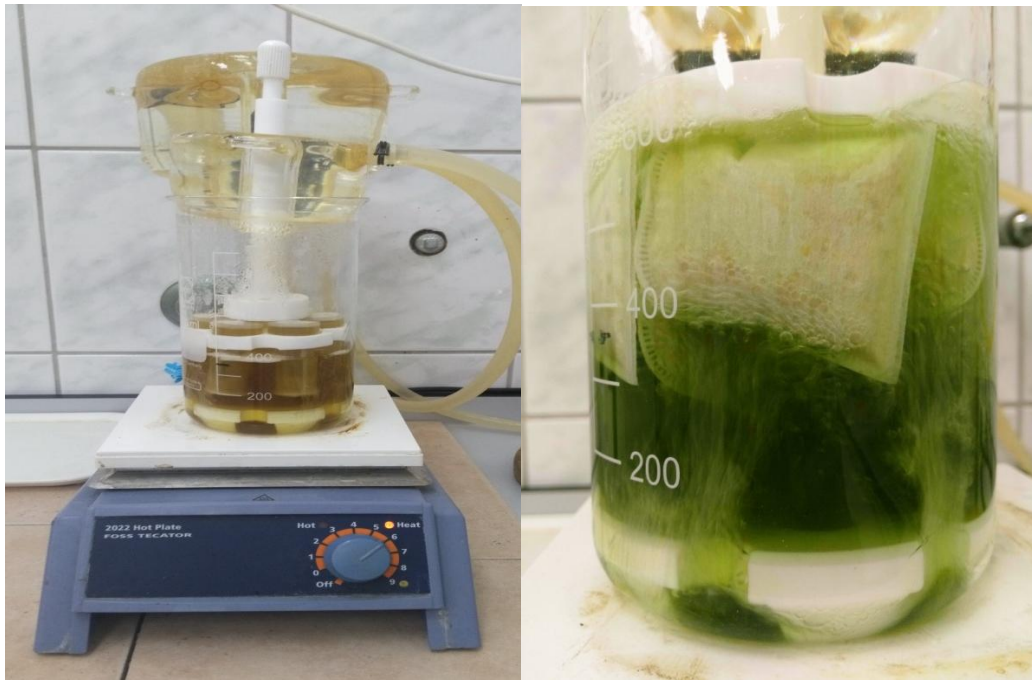
spremljeni su u zrakonepropusne vrećice i čuvani do kemijskih analiza određivanja sadržaja NDV (Van Soest i sur.,1991), te IVNDFD-a i probavljivosti ST nakon 24 i 48 sati u Daisy^{II} ANKOM inkubatoru (Holden,1999). Priprema uzorka određena je u skladu s normom HRN ISO 6498:2001 (Hrvatski zavod za norme).

3.3. Kemijske analize

Sve kemijske analize provedene su u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja. Provedene su u prosušenim i samljevenim uzorcima kukuruzne silaže cijele biljke hibrida Bc 462.

3.3.1. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana (NDV)

Sadržaj NDV-a određen je prema uputama proizvođača FibertecTM sustava – aparature za iskuhavanje i hladnu ekstrakciju (Fibertec system 2021 Fiber cap, Foss Tecator, Švedska). Na vagi Mettler Toledo AB 204 S (Mettler Toledo International, Švicarska) prvo su izvagane prosušene prazne Fiber cap kapsule s poklopcem. Nakon vaganja uzoraka u Fiber cap kapsule na otprilike 0,5 g, uzorci su potopljani u hladnu otopinu detergenta u posudi za kuhanje te je dodan Na₂SO₄. Na kapsule je zatim postavljen držač kako kapsule ne bi isplivale te na posudu za kuhanje hladilo. Nakon što je otopina zakuhala, temperatura na grijaču se smanjila te su se uzorci kuhali 1 sat uz povremeni miješanje (Slika 3.3.1.1., Slika 3.3.1.2.). Nakon kuhanja, uzorci su isprani vrućom destiliranom vodom u 4 do 5 navrata, nakon čega su odmašćeni u acetonu na 30-ak sekundi (Slika 3.3.1.3.). Posloženi uzorci na Petrijevoj zdjelici stavljeni su na sušenje u sušionik na 105 °C preko noći do konstantne mase (min sušenje 5-6 sati) (Slika 3.3.1.4.). Nakon sušenja uzorci su ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Kapsule su zatim stavljane u lončice za žarenje, i spaljene u mikrovalnoj peći 4 h na 600 ± 10 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru uzorci su izvagani i na temelju masa uzorka prije i nakon kuhanja u neutralnom detergentu, te mase ostatka pepela i konstanti specifičnih za kapsule u kojima se nalazio uzorak izračunat je sadržaj NDV-a.



Slika 3.3.1.1. i Slika 3.3.1.2. Kuhanje uzoraka u neutralnom detergentu
Izvor: Vlastiti izvor



Slika 3.3.1.3. Odmaščivanje uzoraka u acetonu nakon kuhanja u neutralnom detergentu
Izvor: Vlastiti izvor



Slika 3.3.1.4. Sušenje uzoraka u sušioniku

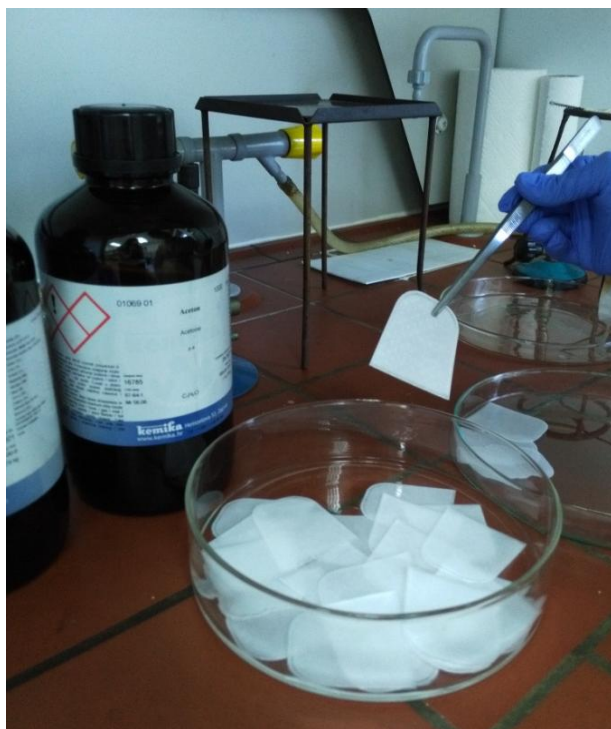
Izvor: Vlastiti izvor

3.3.2. Određivanje *in vitro* buražne probavljivosti ST i NDV-a

Buražna *in vitro* probavljivost suhe tvari i NDV-a nakon 24 i 48 sati u DAISY^{II} inkubatoru (Slika 3.3.2.2.) pri 39 °C određena je prema uputama proizvođača (Ankom, 2005). Vrećice za određivanje probavljivosti, F57 (Ankom, SAD), odmašćene su kratkotrajnim namakanjem u acetonu i prosušene na 103 °C (Slika 3.3.2.1.). Uzorak je izvagan u prethodno izvagane vrećice (oko 0,5 g) nakon čega su vrećice zavarene. Prije dodavanja buražnog soka u otopinu za inkubaciju u svaku od inkubacijskih posuda prebačeno je 1600 mL otopina pufera A i B (Tablica 3.) koje su zatim inkubirane 24 ili 48 sati na 39 °C.

Tablica 3. Sastav otopina pufera A i B.

Otopina pufera A	Otopina pufera B
Natrijev klorid	Natrijev karbonat
Kalcijev klorid dihidrat	Natrijev sulfid nanohidrat
Urea	Destilirana voda
Destilirana voda	



Slika 3.3.2.1. Odmaščivanje vrećica za određivanje probavljivosti

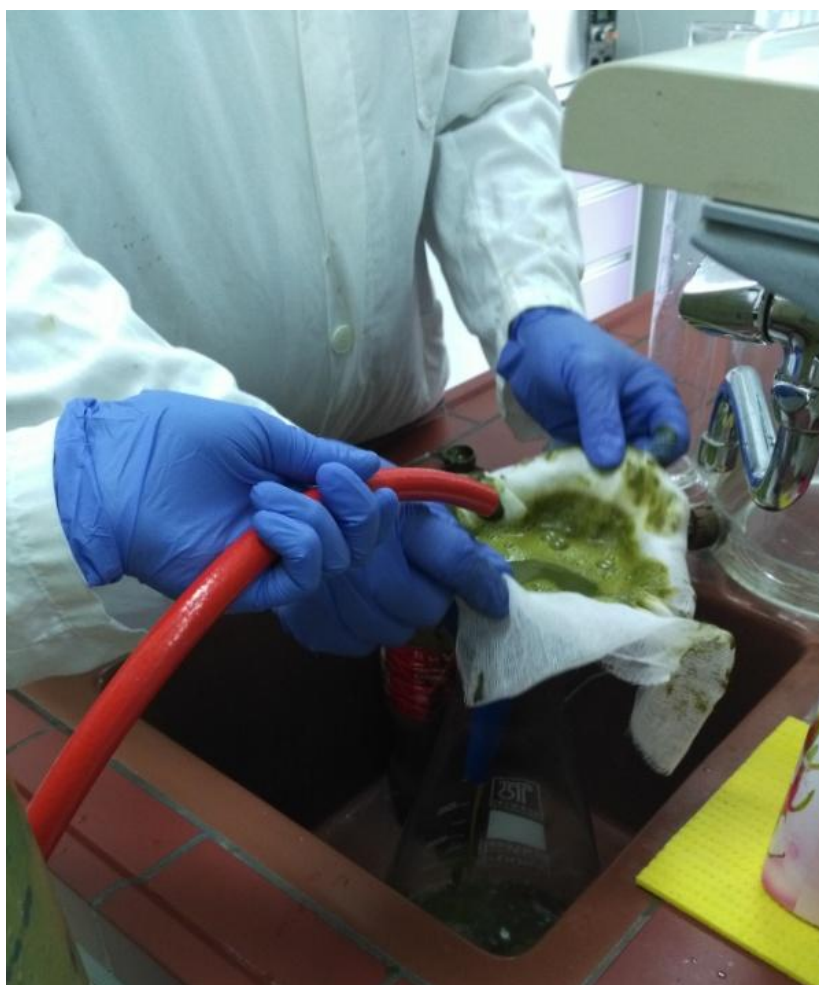
Izvor: Vlastiti izvor



Slika.3.3.2.2. Određivanje buražne *in vitro* probavljivosti u DAISY^{II} Inkubatoru

Izvor: Vlastiti izvor

Buražni sadržaj za analize probavljivosti uzet je sondom za izuzimanje buražnog soka iz tri krave koje su bile na ispaši te hranjene standardnim obrokom koji se sadržavao kukuruznu silažu. Buražni sadržaji spojeni su u zajednički uzorak buražnog sadržaja za inkubaciju. Prije same inkubacije, buražni sadržaj je homogeniziran i filtriran kroz četiri sloja gaza pod strujom ugljikovog dioksida (Slika 3.3.2.3.). 400 mL buražnog soka dodano je u svaku inkubacijsku posudu, pod strujom ugljikovog dioksida. Vrećice su zatim inkubirane u smjesi buražnog sadržaja i prethodno pripremljenog pufera. Nakon definiranog perioda inkubacije (24 i 48 sati) vrećice su isprane u ledenoj vodi kako bi se zaustavila razgradnja i isprali ostaci bakterija s vrećica. Nakon ispiranja vrećice su prosušene 48 sati na 40 °C i izvagane. Razlika u masi vrećica prije inkubacije i nakon inkubacije dala je postotak probavljene suhe tvari u određenom vremenu inkubacije. Nakon vaganja, masa vrećica predstavljala je masu neprobavljenog ostatka. Vrećice su zatim iskorištene za određivanje sadržaja NDV-a u neprobavljenom ostatku uzorka. Pri tome je korištena već opisana metoda iskuhavanja u neutralnom detergentu, ali direktno u vrećicama za probavljivost.



Slika 3.3.2.3. Filtriranje buražnog soka pod strujom ugljikovog dioksida

Izvor: Vlastiti izvor

3.4. Statistička analiza

Poljski pokus bio je postavljen prema split plot planu u pet ponavljanja. Iz tako definiranih uzoraka pripremljene su silaže cijele biljke kukuruza u dva različita tretmana. Silaže su držane tijekom produljenog čuvanja od godine dana. Glavni utjecaji bili su tretman siliranja i vrijeme te njihove interakcije. Kao slučajni utjecaj definirana su ponavljanja i interakcije ponavljanja s tipom tretmana (dodatak inokulanta i kontrola bez dodatka). Obrada podataka prije statističke analize obavljena je pomoću računalnog paketa MS Office programa. Statistička obrada dobivenih podataka promatranih parametara (sadržaj NDV, probavljivost suhe tvari i NDV-a nakon 24 i 48 sati) provedena je upotrebom statističkog programa SAS (SAS Institute, 2003) procedurom MIXED. Značajnost glavnih utjecaja ili njihove interakcije utvrđena je ako je $P < 0,05$.

4. Rezultati i rasprava

Buražna probavljivost vlakana ima središnju ulogu u opskrbi goveda energijom i važan je aspekt u održavanju zdravlja probavnog sustava životinja. Kroz literaturu je zabilježen utjecaj vlakana i njihove probavljivosti na performanse životinja i unos ST (Oba i Allen, 1999), no samo predviđanje njihove probavljivosti uvelike bi pomoglo u procjeni iskoristive energije iz krmnih smjesa. Nepoznat je utjecaj jednogodišnjeg čuvanja silaže na probavljivost vlakana kao i utjecaj inokulanta na sastav i probavljivost vlakana, stoga su u ovom istraživanju ispitani utjecaji odležavanja silaže i dodataka inokulanta na sadržaj vlakana, probavljivost ST i NDV. Uzorci su ispitani kroz 8 vremenskih točaka od početne zelene mase (0. dan) do godine dana odležavanja (364. dan). Za određivanje *in vitro* probavljivosti pratila se probavljivost nakon 24 sata kao parametar koji se promatra kod visokoproduktivnih i probavljivost nakon 48h kod niskoproduktivnih mliječnih krava (Hoffman i sur., 2006). Utjecaj ispitivanih tretmana (dodatka inokulanta i kontrole) te vremena produljenog odležavanja i njihovih interakcija na probavljivost ST i NDV-a nakon 24 i 48 sati prikazan je u Tablici 4..

Tablica 4. Utjecaj dodatka inokulanta i vremena siliranja, te njihovih interakcija na sadržaj NDV-a, probavljivost suhe tvari i NDV-a u silažama cijele biljke kukuruza nakon 24 i 48 sati

	NDV	IVDMD 24h	- IVDMD 48h	- IVNDFD 24h	- IVNDFD- 48h
Vrijeme	***	*	***	NS	**
Inokulant	***	NS	NS	NS	NS
Vrijeme x Inokulant	**	NS	NS	NS	NS

NDV – neutralna detergent vlakna, IVDMD – *In vitro* probavljivost suhe tvari (*In vitro* dry mater digestibility), IVNDFD – *In vitro* probavljivost neutralnih detergent vlakana (*In vitro* neutral detergent fiber digestibility), *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0,05$; NS $P > 0,05$

Produženo vrijeme odležavanja ima značajan utjecaj ($P < 0,05$) na sve promatrane parametre u istraživanju isključujući probavljivost NDV-a (IVNDFD) nakon 24 sata inkubacije, što znači da vrijeme skladištenja ne mijenja IVNDFD kod visokoproduktivnih krava.

Zabilježen utjecaj inokulanta na parametre istraživanja pokazuju nam da je jedini signifikantni utjecaj onaj na udio NDV-a u ST silaže cijele biljke kukuruza. Na ostale promatrane parametre utjecaj dodatka inokulanta nije bio statistički značajan.

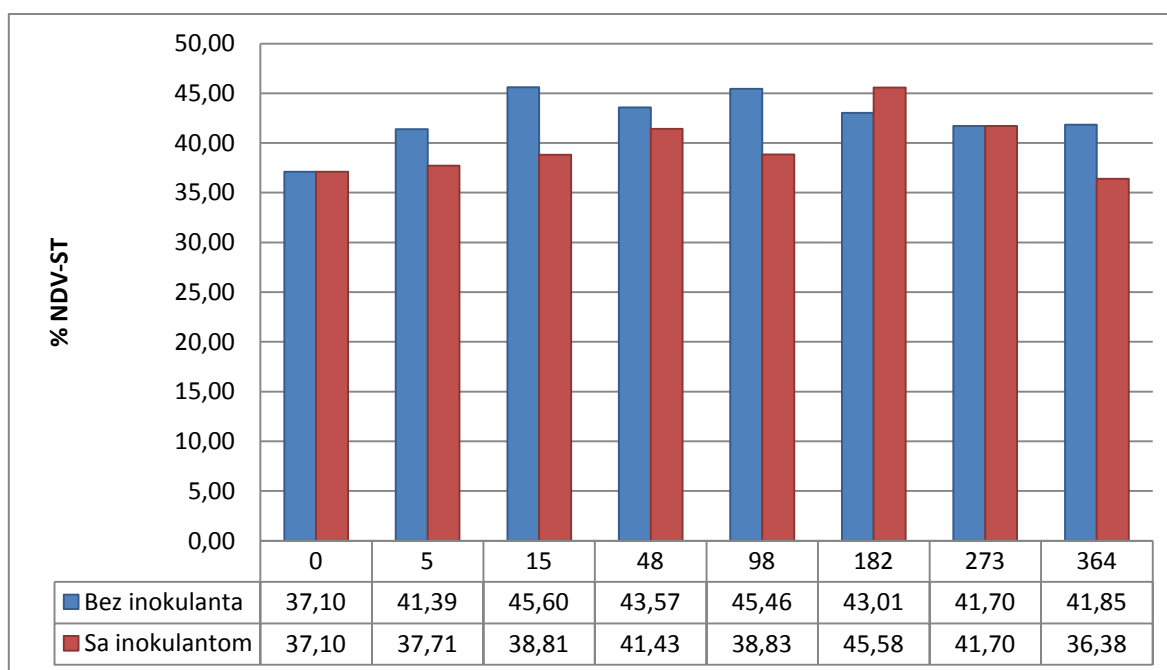
Interakcija produženog vremena odležavanja silaže i dodataka inokulanta signifikantna je u jedino za udio NDV-a u ST silaže cijele biljke kukuruza od istraživanih parametara.

Prema rezultatima kombinirane analize variance, dodatak inokulanta je utjecao jedino na udio NDV, dok su promatrani parametri probavljivosti bili samo pod utjecajem vremena odležavanja.

4.1. Sadržaj NDV-a u ST

Utvrđeno je da udio NDV-a iz voluminoznih izvora izaziva salivaciju i pojačano žvakanje, čime utječe na zdravlje probavnog sustava, te ima pozitivan utjecaj na performanse životinja (Da Silva i Santos, 2016, Oba i Allen, 1999). Udio NDV-a u istraživanim silažama cijele biljke kukuruza tijekom svih osam vremenskih točaka skladištenja prikazana je u Grafikonu 4.1.1.. Rezultati prikazuju povećanje udjela NDV-a tijekom ispitivanog razdoblja od godine dana u odnosu na zelenu masu. Kasnije otvaranje silaže kao i dodatak inokulanta imali su signifikantan utjecaj na sadržaj NDV-a u silaži cijele biljke kukuruza. Važno je uočiti da je i interakcija tih dviju varijabli utjecala na promjene udjela NDV-a.

Grafikon 4.1.1. Srednje vrijednosti sadržaja NDV-a u ST silaže cijele biljke kukuruza s dodatkom i bez dodatka inokulanta tijekom promatranog razdoblja i vremenskih točaka (0., 5., 15., 48., 98., 182., 273. i 364. dan)



Svježa masa za siliranje (0. dan) imala je vrijednosti NDV-a (37,1%) niže od onih zabilježenih u literaturi. Prema Der Bedrosian i sur. (2012), udio NDV-a u ST zelene mase za siliranje kretao se između 40 – 48%, dok Johnson i sur. (1999) navode vrijednosti u granicama od 42 – 45,4% NDV-a u ST. Kroz iduće vremenske točke vidljiva su povećanja udjela NDV-a izuzimajući 364. dan gdje je u silažama s dodanim inokulantom zabilježen pad udjela NDV-a u ST (36,38%), čemu uzrok može biti kiselinom uzrokovana hidroliza hemiceluloze (Der Bedrosian i sur., 2012).

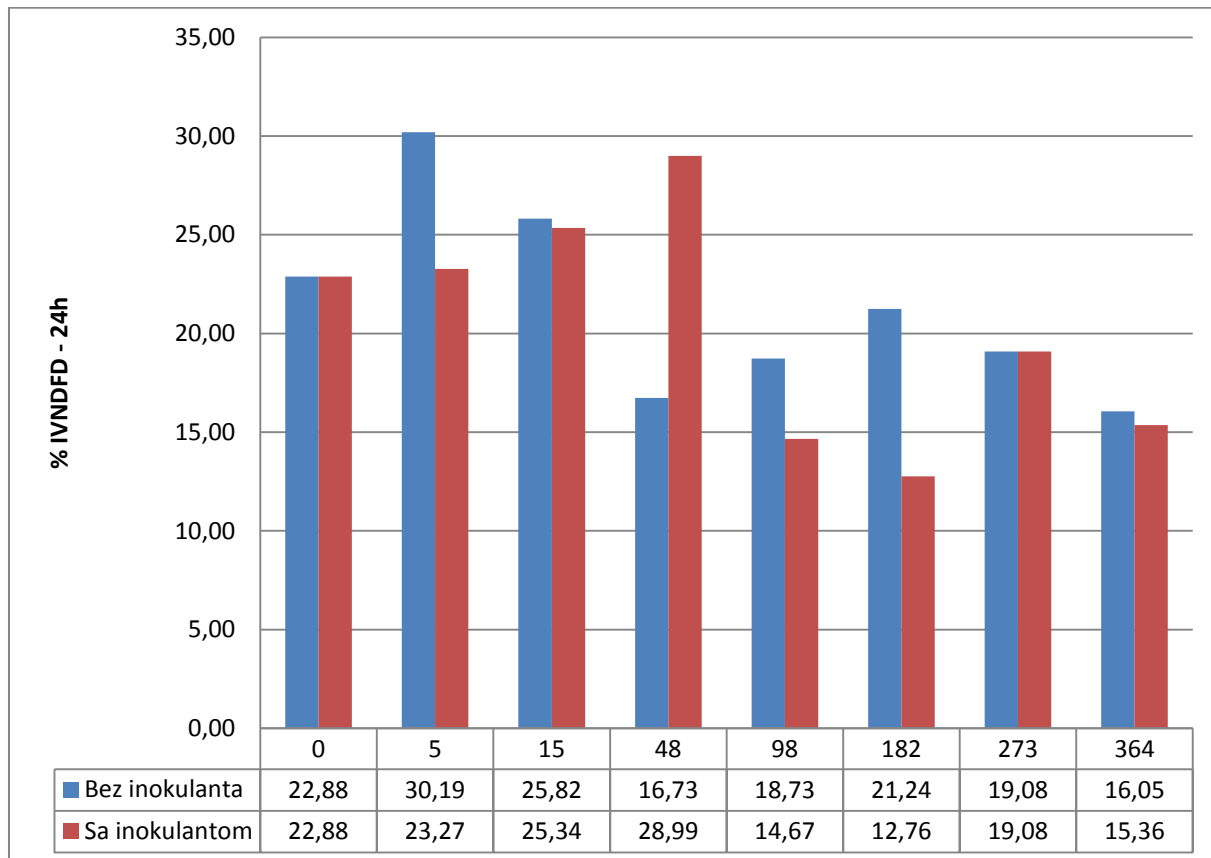
Veći je udio NDV-a kod uzoraka bez dodatka inokulanta nego u uzorcima s dodanim inokulantom, osim u 182. i 273. danu gdje je vidljiva interakcija vremena i inokulanta i silaže s dodanim inokulantom bilježe veću ili jednaku vrijednost NDV. Uzorci bez dodatka inokulanta 15. dan (45,6%) i 98. dan (45,46%) bilježe i 20% veće vrijednosti od nultog uzrokovanja. Johnson i sur. (2002) također su zabilježili veće vrijednosti NDV-a kod ne tretiranih uzoraka (40,1%) nego kod uzoraka s dodatkom inokulanta (38,9%). Međutim, Kleinschmit i Kung (2006) bilježe više vrijednosti NDV-a s dodatkom inokulanta (50,3%) nego bez inokulanta (45,9%). U istraživanju Der Bedrosian i sur. (2012) navode da produženo vrijeme čuvanja silaže nije značajno utjecalo na sadržaj NDV-a u ST, i bilježe pad udjela NDV-a s vremenom skladištenja silaže.

Povećanje sadržaja NDV-a s vremenom odležavanja zabilježeno u ispitivanim uzorcima silaža moguće je objasniti razgradnjom ostalih hranjivih tvari tijekom čuvanja silaže i kemijskih analiza uzorka. Coblenz i Hoffman (2008) navode da gubitak hranjivih tvari poput šećera, izazvanih Maillard reakcijom, u uzorku prividno povećavaju udio NDV-a u ST. To je važna spoznaja jer su šećeri probavljiviji od vlakana, te njihov gubitak rezultira smanjenjem energije krmne smjese. Moguće je da povećanje sadržaja NDV-a nema biološkog objašnjenja, nego je rezultat greške metode i malog broja ponavljanja korištenih u pokusu (Hoffman i sur., 2003).

4.2. IVNDFD nakon 24 sata inkubacije

Vlakna se probavljaju u buragu uz pomoć mikroorganizama, te se stvaraju hlapljive masne kiseline koje služe kao izvor energije za preživača. Stoga je probavljivost vlakana bitna osobina krmiva, te povećanje probavljivosti omogućuje veći unos ST, brže popunjavanje buraga te shodno tome bolja proizvodna svojstva životinje. Tako su Oba i Allen (1999) pronašli vezu između IVNDFD-a i životinjskih performansi, gdje se povećanjem IVNDFD-a povećavala mliječnost i unos ST kod mliječnih krava. IVNDFD je postao važan parametar kvalitete i rangiranje kukuruzne silaže zbog učinka na produktivnost mliječnih krava. IVNDFD nakon 24 sata inkubacije povezuje se s intenzivnom proizvodnjom mlijeka (Hoffman i sur., 2006). Ispitane varijable, vrijeme odležavanja, dodatak inokulanta i njihova interakcija nemaju značajan statistički utjecaj na IVNDFD-a silaže cijele biljke kukuruza (Tablica 4.). Grafikon 4.2.1. prikazuje srednje vrijednosti IVNDFD-a uzoraka nakon 24 sata inkubacije.

Grafikon 4.2.1. Srednje vrijednosti IVNDFD-a silaže cijele biljke kukuruza inkubiranih 24 sata, s dodatkom i bez dodatka inokulanta tijekom promatranog razdoblja i promatranih vremenskih točaka (0., 5., 15., 48., 98., 182., 273. i 364. dan)



Zelena masa za siliranje imala je vrijednosti IVNDFD-a (22,88%) niže od onih zabilježenih u literaturi; Ferrareto i sur. (2015) bilježe % IVNDFD od 57,3%. Tijekom vremena odležavanja također su zabilježene niže vrijednosti IVNDFD-a u siliranoj masi naspram onih u literaturi., Tako silaža cijele biljke kukuruza prema Da Silva i Santos (2016) postiže IVNDFD od 34 - 45%, Ferrareto i sur. (2015) bilježe % IVNDFD od 54,7 - 56,2% tijekom produženog vremena čuvanja silaže, dok Hoffman i sur. (2003) bilježe % IVNDFD od 32 – 61%. Uzrok ovako niskih vrijednosti mogu biti aktivnosti buražne tekućine tijekom inkubacije, pošto je moglo doći do promjena u tekućini tijekom izuzimanja ili transporta (Goeser i Combs, 2009), zbog promjene pH buražne tekućine (Bossen i sur., 2008) ili zbog laboratorijske greške (Hoffman i sur., 2003).

Rezultati pokazuju povećanje IVNDFD do 15. dana skladištenja (kontrola i dodatak inokulanta) odnosno 48. dana (silaže s dodatkom inokulanta) te nakon toga IVNDFD pada ispod 22,88%. Najniža IVNDFD zabilježena je 182. dana u silažama s dodanim inokulantom (12,76%) dok silaže bez dodanog inokulanta bilježe višu vrijednost (21,24%). Uzrok ovako niske vrijednosti IVNDFD spram ostalih rezultata može biti aktivnost dodanog inokulanta ili

laboratorijska greška (Hoffman i sur., 2003), a također je moguća povezanost niskih vrijednosti s razgradnjom vlakana u početku procesa siliranja (Ferrareto i sur., 2015). Najviša IVNDFD postignuta je 5. dan u kontrolnim silazama (30,19%) te je ta vrijednost zamjetno veća od one nultog uzorkovanja (22,88%). Weinberg i sur. (2007) su dodavanjem inokulanta kukuruznoj silaži zabilježili više vrijednosti IVNDFD-a nakon 24 sata inkubacije (36,4%, 35,9%, 36,6%) te navode moguće povećanje IVNDVD-a dodavanjem nekih inokulanta. Međutim, prema prijašnjim istraživanjima, Der Bedrosian i sur. (2012) navode sniženje IVNDFD-a s vremenom skladištenja.

IVNDFD nakon 24 sata inkubacije viša je kod uzoraka bez dodatka inokulanta nego u uzorcima s dodanim inokulantom.

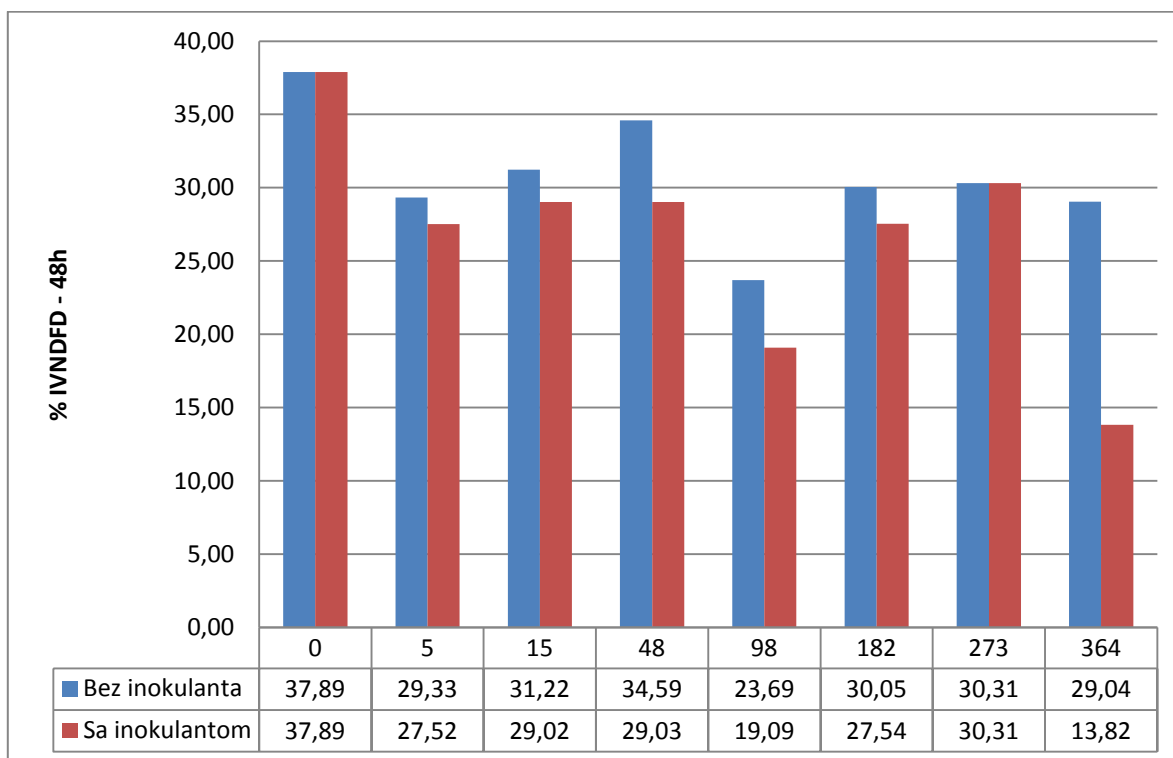
Probavljivost u silazama s inokulantom raste tijekom skladištenja do 98. dana kada IVNDFD naglo pada ispod vrijednosti nultog uzorkovanja. Rezultati pokazuju pad IVNDFD-a s vremenom skladištenja. Također, dobivene vrijednosti pokazuju da silaže cijele biljke kukuruza imaju niže vrijednosti IVNDFD-a kod visokoproduktivnih krava, nego zelena masa.

Dobiveni rezultati sugeriraju da se probavljivost NDV-a povećava odležavanjem, ali samo kroz prvih mjesec dana te dalje skladištenje snižava IVNDFD. Prema literaturnim izvorima, odležavanje silaže trebalo bi povisiti probavljivost vlakana i to za 4% (Grbeša, 2016., Weinberg i sur., 2007., Oba i Allen, 1999., Kung, 2001). Međutim, prema Ferrareto i sur., (2015) moguće je smanjenje IVNDFD tijekom zagrijavanja i kemijskih promjena u zelenoj masi. Također, Der Bedrosian i sur. (2012) bilježi niži IVNDFD tijekom produženog vremena čuvanja silaže kao i Herrmann i sur. (2011) koji bilježe niže vrijednosti nakon 365 dana skladištenja nego u zelenoj masi. Istraživanjem na silaži kukuruza Hu i sur. (2009) dobili su također niže vrijednosti IVNDFD-24 sata dodavanjem inokulanta; ne tretirana silaža imala je 44,3% a tretirana 41,0% IVNDFD-a.

4.3. IVNDFD nakon 48 sati inkubacije

IVNDFD nakon 48 sati u ovom ispitivanju viša je nego kod 24 sata inkubacije. Dobivene vrijednosti IVNDFD-a nakon 48 sati inkubacije kreću se od 37,89% (kod zelene mase za siliranje) do 13,82% (364. dan uzorkovanja). Međutim, Hoffman i sur. (2003) navode da se vrijednosti IVNDFD-a - 48 sati kod kukuruzne silaže kreću od 47,1 – 64%. Razlog zamjetno nižih vrijednosti u ovom istraživanju može biti lošija kvaliteta buražnog soka (Goeser i Combs, 2009). Grafikon 4.3.1. prikazuje rezultate dobivene nakon 48 sati inkubacije uzoraka; prikazane su srednje vrijednosti IVNDFD-a tijekom svih ispitivanih vremenskih točaka. Dobiveni rezultati ukazuju na niže vrijednosti IVNDFD-a kod uzoraka s dodanim inokulantom spram kontrolne skupine.

Grafikon 4.3.1. Srednje vrijednosti IVNDFD-a silaže cijele biljke kukuruza inkubiranih 48 sati, s dodatkom i bez dodatka inokulanta tijekom promatranog razdoblja, svih promatranih vremenskih točaka (0., 5., 15., 48., 98., 182., 273. i 364. dan)



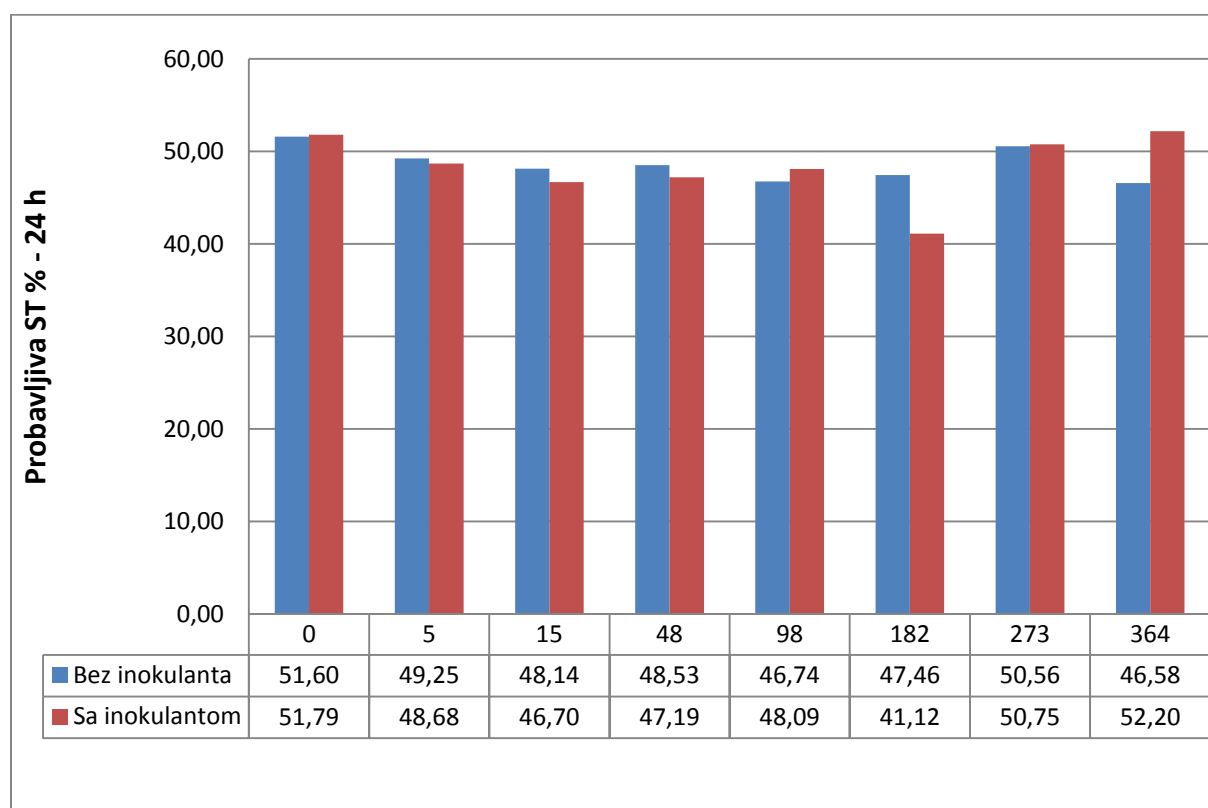
Zelena masa za siliranje imala je vrijednosti IVNDFD-a (37,89%) niže od onih zabilježenih u literaturi. Filya (2003) navodi sniženje IVNDFD-a nakon 90 dana skladištenja silaže te je bilježio IVNDFD od 31,27%. Prema Der Bedrosian i sur. (2012) produženo vrijeme skladištenja dovelo je do sniženja vrijednosti IVNDFD u silažama kukuruza. Najniža zabilježena probavljivost (13,82%) je 364. dan pod utjecajem u silažama s inokulantom. Moguće je da je razlog ovako niske vrijednosti (13,82%) greška metode. Također, iz rezultata je vidljivo da IVNDFD naglo pada s 5. danom siliranja, što bi se moglo objasniti naglom razgradnjom vlakana početkom siliranja (Der Bedrosian i sur., 2012).

4.4. Probavljivost ST nakon 24 sata inkubacije

In vitro probavljivost ST (IVDMD) kao i unos ST najčešće su povezani sa sadržajem i količinom vlakana, odnosno ovise o kvaliteti voluminozne krme. Prema prijašnjim istraživanjima IVDMD povezuje se s IVNDFD, odnosno porast IVNDFD-a utječe na porast IVDMD-a (Hoffman i sur., 2003), te viša IVDMD pozitivno utječe na proizvodne osobine životinja (Bal i sur., 2000). Prema Holden (1999) IVDMD silaže kukuruza iznosi 62,85%, dok su podaci dobiveni u ovom istraživanju niži. Kao i kod nižih vrijednosti IVNDFD-a, i u ovom slučaju može pretpostaviti da je utjecaj na rezultate imala lošija kvaliteta buražnog

soka. Istraživanjem su dobiveni rezultati koji ukazuju na statističku značajnost vremena odležavanja na IVDMD nakon 24 sata inkubacije silaže cijele biljke kukuruza. Međutim, treba napomenuti da dobivene vrijednosti IVDMD-a bilježe pad, a zatim porast vrijednosti, iz čega možemo pretpostaviti probavljivost ST nema pravolinijski trend, već je promjenljiva ovisno o duljini odležavanja silaža. Prema Ayres (1991) moguće su vrijednosti varijabilne zbog nedovoljnog broja ponavljanja prilikom određivanja probavljivosti, te se predlaže povećanje broja ponavljanja i ispitivanih uzoraka.

Grafikon 4.4.1. Srednje vrijednosti IVDMD silaže cijele biljke kukuruza inkubiranih 24 sata, s dodatkom i bez dodatka inokulanta tijekom promatranog razdoblja, svih promatranih vremenskih točaka (0., 5., 15., 48., 98., 182., 273. i 364. dan)



Uspoređujući rezultate tijekom jednogodišnjeg skladištenja s nultim danom vidljive su niže vrijednosti IVDMD. Jedino je 364. dan u silažama s dodanim inokulantom zabilježena nešto viša IVDMD (52,20%) u odnosu na zelenu masu (51,79%). Filya (2004) bilježi probavljivost ST od 35,5% nakon 90 dana skladištenja silaže kukuruza, a dobivene vrijednosti ovog istraživanja u tom vremenskom periodu su više (46,74%). Weinberg (2007) bilježi niže vrijednosti kod kontrolne silaže, dok IVDMD silaže kukuruza s dodatkom inokulanta postiže vrijednosti od 59,7%.

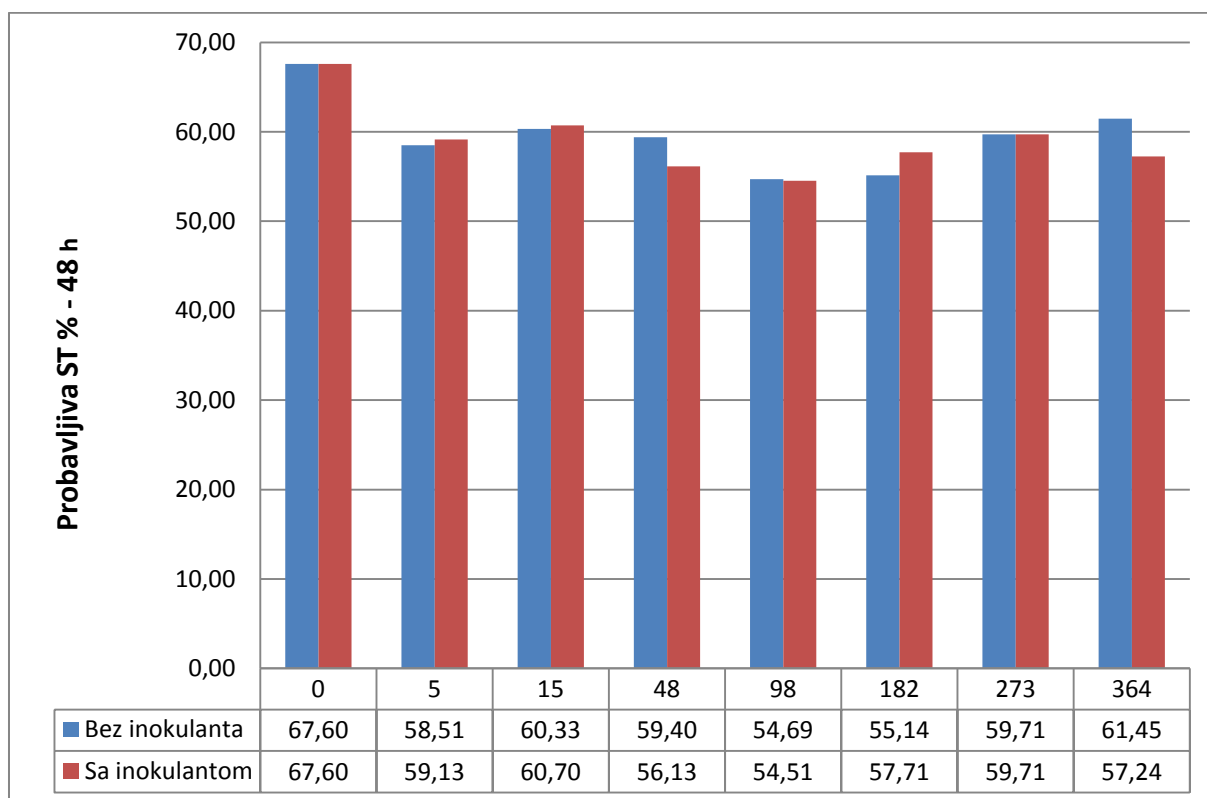
Neutvrđeni utjecaj dodatka inokulanata na probavljivost ST u skladu je s drugim istraživanjima. Weinberg i Muck (1996) navode kako dodatak inokulanta u silaži kukuruza

nije imao značajan utjecaj na IVDMD. Međutim, prema drugim izvorima može postojati značajan utjecaj dodatka inokulanta na IVDMD, tako Weinberg (2007) bilježi značajan utjecaj i povišenje vrijednosti IVDMD-a. IVDMD u istraživanju Kung (2001) se povećala dodatkom inokulanta u trećini slučajeva, no u ovom istraživanju to nije bio slučaj.

4.5. Probavljivost ST nakon 48 sati inkubacije

Probavljivost ST nakon 48 sati inkubacije usko se povezuje s manje intenzivnom proizvodnjom mlijeka (Hoffman i sur., 2003). Probavljivost je u ovom slučaju viša od one nakon inkubacije od 24 sata, pošto se krma duže zadržava u buražnoj tekućini, te se veći dio probavi (Hoffman i sur., 2001). Zapažen je značajan utjecaj vremena na IVDMD - 48 sati ($P < 0,0001$). Uočen je signifikantan pad IVDMD-a - 48 sati tijekom odležavanja silaža spram zelene mase za siliranje. Zamijećen je pad vrijednosti koje u određenim vremenskim točkama rastu, a zatim opet padaju. Takve vrijednosti moguće je objasniti s greškom metode uz pretpostavku nedovoljnog broja ponavljanja (Ayres, 1991). Grafikon 4.5.1. prikazuje rezultate dobivene u istraživanju za IVDMD nakon 48 sati.

Grafikon 4.5.1. Srednje vrijednosti IVDMD silaže cijele biljke kukuruza inkubiranih 48 sati, s dodatkom i bez dodatka inokulanta tijekom promatranog razdoblja, svih promatranih vremenskih točaka (0., 5., 15., 48., 98., 182., 273. i 364. dan)



Nema razlike između kontrolnih silaža i silaža s dodanim inokulantom u IVDMD. Slične rezultate dobio je i Filya (2003) gdje su zabilježene slične vrijednosti kod kontrolne skupine (46,37%) i kod dodatka inokulanta (46,60%), također nema utjecaja na probavljivost ST. Weiberg (2007) bilježi povišenje vrijednosti IVDMD-a – 48 sati dodatkom inokulanta (kontrola 66,6%, inokulant 70,2%).

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja utjecaja komercijalnog inokulanta i produljenog vremena odležavanja silaža na sadržaj vlakana mjerenih kao neutralna detergent vlakna (NDV) i *in vitro* probavljivosti NDV i ST u silazama cijele biljke kukuruza može se zaključiti sljedeće:

- Produljeno vrijeme odležavanja silaže povećava sadržaj NDV-a silaža kukuruza te smanjuje buražnu *in vitro* probavljivost suhe tvari i neutralnih detergent vlakana inkubiranih 48 sati.
- Dodatak komercijalnog inokulanta tijekom siliranja cijele biljke kukuruza ne mijenja buražnu *in vitro* probavljivost suhe tvari i neutralnih detergent vlakana inkubiranih 24 i 48 sati, već samo smanjuje ukupnu količinu NDV-a silaža.

Dobiveni rezultati djelomično su u suprotnosti s očekivanim, što samo govori o kompleksnosti istraživane teme, te potrebi sistematičnog analiziranja sastava i probavljivosti silaže cijele biljke kukuruza, uz neophodno analiziranje i ostalih hranjiva, kao što je škrob. Izbor aditiva za spremanje silaže i njegova primjena također mogu imati utjecaj na dobivene rezultate, čime se stvara potreba za daljnjim istraživanjima, te implementacija dobivenih rezultata u hranidbi preživača.

6. Literatura

1. Allen M. S. (2000). Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 83:1598–1624.
2. Ankom, < <https://www.ankom.com/> >. Pristupljeno 29.8. 2017.
3. Ayres J.F. (1991). Sources of error with *in vitro* digestibility assay of pasture feeds. *Crass and Forage Science*, Volume 46, 89-97.
4. Bal M. A., Shaver R. D., Al-Jobeile H., Coors J. G., Lauer J. G. (2000). Corn Silage Hybrid Effects on Intake, Digestion, and Milk Production by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 83:2849–2858.
5. Bossen D., Mertens D.R., Weisbjerg M. R. (2008). Influence of Fermentation Methods on Neutral Detergent Fiber Degradation Parameters. *Journal of Dairy Science*, 91:1464–1476.
6. Coblenz W., Hoffman P. (2008). Heat Damaged Forages: Effects on Forage Quality. *Fokus on Forage*, Vol 10: No. 8.
7. Da Silva T., Santos E. M. (2016). Advances in Silage Production and Utilization. In: Maximizing Fiber Utilization of Silage in Ruminants (Refat B., Yu P.). InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/64471> [online] < <https://www.intechopen.com/books/advances-in-silage-production-and-utilization> > Pristupljeno 29. kolovoza 2017.
8. Der Bedrosian M. C., Nestor Jr. K. E., Kung Jr. L. (2012). The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 95 :5115–5126.
9. FAOSTAT (2016). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Databaset, <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Pristupljeno: 11. rujna 2017.
10. Ferraretto L.F., Shaver R.D., Massie S., Singo R., Taysom D.M., Brouillette J.P. (2015). Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal *in vitro* starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. *The Professional Animal Scientist* 31 (2015):146–152.
11. Filya I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1080–1086.
12. Filya I. (2004). Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*, 116 (2004) 141–150.
13. Goering H.K. i Van Soest P.J. (1970). Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, And Some Applications). Agriculture Handbook No.379, Agricultural Research Service UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.
14. Goeser J. P., Combs D.K. (2009). An alternative method to assess 24-h ruminal *in vitro* neutral detergent fiber digestibility. *Journal of Dairy Science*, 92 :3833–3841.
15. Grbeša D. (2016). Hranidbena svojstva kukuruza. Bc Institut, Zagreb.

16. Herrmann C., Heiermann M., Idler C. (2011). Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology*, 102 (2011) 5153–5161
17. Hoffman P. C., Lundberg K. M., Bauman L. M., Shaver R. D. (2003). In vitro NDF Digestibility of Forages: The 30 vs. 48 hour debate. *Focus on Forage - Vol 5: No. 16*.
18. Hoffman P. C., Shver R.D., Combs D. K., Undersander D. J., Bauman M. L., Seeger T. K. (2001). Understanding NDF Digestibility of Forages. *Focus on Forage*, Vol 3: No. 10.
19. Hoffman P., Combs D., Undersander D. (2006). Using Neutral Detergent Fiber Digestibility in Dairy Ration Formulation. *Forage Focus, DAIRY - NOV/DEC 2006*.
20. Holden L. A. (1999). Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, 82:1791–1794.
21. Hrvatski zavod za norme, <
<http://31.45.242.218/HZN/Todb.nsf/wFrameset2?OpenFrameSet&Frame=Down&Src=%2FHZN%2FTodb.nsf%2F66011c0bda2bd4dfc1256cf300764c2d%2Fb4ac6d04611b797ac1257b58002bf643%3FOpenDocument%26AutoFramed> >. Pristupljeno 18.9.2017.
22. Hu W., Schmidt R. J., McDonell E. E., Klingerman C. M., Kung L. Jr. (2009). The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of Dairy Science*, 92 :3907–3914.
23. Johnson L. M., Harrison J. H., Davidson D., Mahanna W. C., Shinnors K., Linder D. (2002). Corn Silage Management: Effects of Maturity, Inoculation, and Mechanical Processing on Pack Density and Aerobic Stability. *Journal of Dairy Science*, 85:434–444.
24. Johnson L., Harrison J. H., Hunt C., Shinnors K., Doggett C. G., Sapienza D. (1999). Nutritive Value of Corn Silage as Affected by Maturity and Mechanical Processing: A Contemporary Review. *Journal of Dairy Science*, 82:2813–2825.
25. Jurišić, M. (2008). AgBase – Priručnik za uzgoj bilja, I. Tehnologija (agrotehnika) važnijih ratarskih kultura. VIP-V-10-9/06., Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
26. Kaiser A. G., Piltz J.W., Burns H. M., Griffiths N. W. (2003). Successful Silage. Dairy Australia and New South Wales Department of Primary Industries, Orange.
27. Kendall C., Leonardi C., Hoffman P. C., Combs D. K. (2009). Intake and milk production of cows fed diets that differed in dietary neutral detergent fiber and neutral detergent fiber digestibility. *Journal of Dairy Science*, 92:313–323.
28. Kleinschmit D. H., Kung L. Jr. (2006). The Effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus Pentosaceus* R1094 on the Fermentation of Corn Silage. *Journal of Dairy Science*, 89:3999–4004.
29. Kung L., Tung R. S., Yaciorowski O., Buffuy K., Knutsen K. (1991). Effects of plant Cell-Wall-Degrading Enzymes and Lactic Acid Bacteria on Silage Fermentation and Composition. *Journal of Dairy Science*, 74:428442.
30. Kung, L. (2001). Silage fermentation and additives. *Science and Tehcnology in the Feed Industry*, 17: 145-159.

31. McDonald P., Henderson N., Heron S. (1991). The biochemistry of silage. Chalcombe Publications, Kingston, Kent. 7
32. Morrison I. M. (1979). Changes in the cell wall components of laboratory silages and the effect of various additives on these changes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 581-586.
33. Niwińska B. (2012). Digestion in Ruminants In: *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (Chang C.) InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/51574> [online] <<https://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2017.
34. NRC - National Research Council (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. edition. National Academies Press. Washington, DC
35. Oba M., Allen M. S. (1999.) Evaluation of the Importance of the Digestibility of Neutral Detergent Fiber from Forage: Effects on Dry Matter Intake and Milk Yield of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 82:589–596.
36. Oliveira A.S. i sur., (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Jurnal of Dairy Science*, 100:4587–4603.
37. Roth G. W., Heinrichs A. J. (2001). Corn silage production and management. Penn State Extension, Code UC079 05/14pod.
38. SAS Institute (2003). OnlineDoc® Software Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
39. Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
40. Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, New York i London.
41. Weinberg Z. G., Muck R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *Elsevier Science B.V.*, 19 (1996) 53-68.
42. Weinberg Z. G., Shatz O., Chen Y., Yosef E., Nikbahat M., Ben-Ghedalia D., Miron J. (2007). Effect of Lactic Acid Bacteria Inoculants on In Vitro Digestibility of Wheat and Corn Silages. *Journal of Dairy Science*, 90:4754–4762

Životopis

Mirta Skelin rođena je 24. listopada 1992. godine u Zagrebu. Upisala je Gornjogradsku gimnaziju (VI.) u Zagrebu 2007. godine koju završava 2011.godine. 2012. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Animalne znanosti, koji završava u rujnu 2015. godine. Iste godine upisuje smjer Hranidba životinja i hrana na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, kojeg završava u rujnu 2017. godine.